



IRM fonctionnelle chez le rat : défis méthodologiques

Sébastien Reyt

► To cite this version:

Sébastien Reyt. IRM fonctionnelle chez le rat : défis méthodologiques. Autre [cond-mat.other]. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENY073 . tel-00861856

HAL Id: tel-00861856

<https://theses.hal.science/tel-00861856>

Submitted on 13 Sep 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique**

Arrêté ministériel : 7 Août 2006

Présentée par

Sébastien REYT

Thèse dirigée par **Olivier DAVID**

préparée au sein du **Grenoble Institut des Neurosciences**
Équipe 5 « Neuroimagerie fonctionnelle et perfusion cérébrale »
et Équipe 11 « Fonctions cérébrales et neuromodulation »
U836 Inserm-UJF-CEA-CHU
et de l'école doctorale de Physique

IRM fonctionnelle chez le rat : défis méthodologiques

Thèse soutenue publiquement le **9 Novembre 2012**,
devant le jury composé de :

M. François ESTÈVE

PU-PH, INSERM U836, Président

M. Jean-Pierre RENOU

DR2, INRA Clermont-Ferrand, Rapporteur

M. Dominique SAPPEY-MARINIER

MCU-PH, Hospices civils de Lyon – CERMEP – CREATIS, Rapporteur

M. Stéphane LEHÉRICY

PU-PH, CENIR, Examineur

M. Bruno BONAZ

PU-PH, INSERM U836, Examineur

M. Olivier DAVID

CR1, INSERM U836, Directeur de thèse



Avant-Propos

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe 5 du Grenoble institut des neurosciences, « Neuroimagerie fonctionnelle et perfusion cérébrale », anciennement unité INSERM U594 « Neuroimagerie fonctionnelle et métabolique ». J'ai aussi reçu le soutien de l'actuelle plateforme RMN, à l'époque intégrée à l'équipe de recherche.

La mise à jour de la plateforme RMN à mi-parcours de thèse m'a donné l'occasion d'effectuer des développements sur plusieurs machines IRM plus ou moins récentes, et ceci m'a conféré une bonne vue d'ensemble de la RMN. Cependant, le déménagement effectué à cette occasion n'a pas permis de finaliser toutes les études abordées.

Cette thèse est l'œuvre d'un physicien, converti aux expérimentations animales par son attrait pour les neurosciences. Je porterai donc dans ce manuscrit une attention particulière à la physique sous-tendant l'imagerie et aux traitements statistiques inhérents à l'imagerie fonctionnelle. Toutefois, je n'oublierai pas de présenter, grâce à mes connaissances acquises durant cette thèse, les aspects cruciaux que constituent la préparation animale et la neuroanatomie.

Table des matières

Introduction	1
I État de l'art	3
1 L'imagerie par résonance magnétique	5
1.1 Principe de la résonance magnétique nucléaire	5
1.1.1 Le magnétisme nucléaire	5
1.1.2 Comportement du noyau d'hydrogène dans un champ statique	6
1.1.3 Application d'un champ radiofréquence : phénomène de résonance	7
1.1.4 Temps de relaxation	8
1.2 Principe de l'IRM	10
1.2.1 Sélection de tranche	10
1.2.2 Encodage spatial	10
1.2.3 Signal RMN en présence de gradients de champ magnétique	11
1.2.3.1 Espace-k	11
1.2.3.2 Déplacement dans l'espace réciproque	12
1.2.3.3 Remplissage de l'espace réciproque	13
1.3 L'IRM fonctionnelle	15
1.3.1 Principe physiologique	15
1.3.2 Utilisations courantes chez l'homme	16
1.3.3 Avantages et inconvénients de l'IRMf	17
1.3.4 Travaux en imagerie fonctionnelle chez le petit animal	17
2 Contexte clinique	19
2.1 Épilepsie	19
2.1.1 Présentation de la maladie et définitions	19
2.1.2 Épidémiologie	20
2.1.3 Neurophysiopathologie	20
2.1.4 Les différentes crises d'épilepsie	20
2.1.4.1 Crises tonico-cloniques	21
2.1.4.2 Épilepsie absence	21

2.1.4.3	Crises partielles	22
2.1.5	Diagnostic : principe de l'électroencéphalographie (EEG)	22
2.1.6	Traitements médicamenteux et chirurgicaux	23
2.1.7	Intérêt et principe de l'IRMf/EEG	23
2.1.7.1	Intérêt	23
2.1.7.2	Principe	24
2.2	Maladies chroniques de l'intestin	25
3	Techniques de stimulation cérébrale	27
3.1	Stimulation du nerf vague	27
3.1.1	Intérêt thérapeutique	27
3.1.1.1	Dans le cadre de l'épilepsie	27
3.1.1.2	Dans le cadre des maladies chroniques de l'intestin	28
3.1.2	Mécanismes de la stimulation du nerf vague	29
3.1.3	IRMf de la stimulation du nerf vague	30
3.2	Stimulation cérébrale profonde	30
3.2.1	Intérêt thérapeutique	31
3.2.2	Mécanismes de la stimulation cérébrale profonde	32
3.2.3	Étude de la stimulation cérébrale profonde par IRMf	33
3.3	Objectifs et plan	34
II	Développements méthodologiques	37
4	Développements méthodologiques en IRM	39
4.1	La plate-forme IRM de Grenoble	39
4.2	La séquence d'Echo-Planar Imaging	40
4.2.1	La séquence de gradients	40
4.2.2	Reconstruction des images	40
4.2.3	Les artefacts propres à l'EPI	41
4.2.3.1	Conséquences d'une longue fenêtre d'acquisition	41
4.2.3.2	Sensibilité aux artefacts de susceptibilité magnétique	42
4.2.3.3	Alternance du sens des échos	42
4.2.3.4	Imperfections dues au système de gradients	42
4.2.4	La solution : les scans de référence	43
4.2.5	L'EPI multishot	46
4.3	Traitements statistiques en IRM fonctionnelle	48
4.3.1	Paradigmes et régresseurs	48
4.3.2	Le logiciel SPM	48
4.3.3	Modélisation causale dynamique	49

5	Préparation animale	53
5.1	Isoflurane	54
5.1.1	Utilisation en IRM	54
5.1.2	Molécule et considérations pratiques	54
5.1.3	Mode d'action	54
5.1.4	Recueil d'enregistrements EEG sous isoflurane	55
5.2	Kétamine	56
5.2.1	Molécule et mécanismes d'action	56
5.2.2	Utilisation et enregistrements EEG sous kétamine	57
5.3	Médétomidine	57
5.3.1	Molécule et mécanismes d'action	58
5.3.2	Enregistrements EEG sous médétomidine	58
5.3.3	Utilisation en IRMf	58
5.4	Conclusion	59
6	Électrodes compatibles IRM	61
6.1	Problèmes de sécurité	61
6.2	Problèmes liés à l'imagerie	62
6.2.1	Artefacts de susceptibilité magnétique	62
6.2.2	Comparaison de différents matériaux amagnétiques	63
6.2.2.1	Critères pour le choix du matériau de l'électrode	63
6.2.2.2	Platine-irridium	63
6.2.2.3	Or	63
6.2.2.4	Carbone	64
6.3	Protocole de fabrication des électrodes	65
III	Résultats en IRM fonctionnelle chez le rat	67
7	Validation des procédures d'IRMf chez le petit animal	69
7.1	Modifications du couplage neuro-vasculaire : hypercapnie	69
7.2	IRM fonctionnelle de la stimulation électrique de la patte	71
7.2.1	Mise en place du rat dans l'aimant	71
7.2.2	Paramètres d'imagerie	72
7.2.3	Stimulateur utilisé	72
7.2.4	Paramètres de stimulation de la patte	73
7.3	Résultats	73
7.4	Conclusion	74
8	Validation de l'IRMf/EEG chez le GAERS	77
8.1	But de l'étude	77

8.2	Travail effectué	77
8.3	Modèle expérimental utilisé : le GAERS	78
8.4	Perspectives	78
8.5	Article n° 1	78
9	IRMf de la stimulation du nerf vague	95
9.1	Introduction : genèse de l'étude	95
9.2	Premiers résultats	95
9.3	Modulation de la fréquence cardiaque par la SNV	96
9.4	Composante hémodynamique lors d'une augmentation de rythme cardiaque .	97
9.5	Article n° 2	97
9.6	Conclusion	116
10	IRMf de la stimulation cérébrale profonde	117
10.1	Introduction	117
10.2	Protocole d'implantation	118
10.3	Influence de l'implantation sur l'imagerie	120
10.4	Résultats	121
10.4.1	Stimulation du noyau géniculé dorso-latéral	121
10.4.2	Stimulation du gyrus dentelé	122
10.4.3	Stimulation du striatum	125
10.4.4	Stimulation du thalamus	128
10.5	Perspectives	130
	Conclusion	131
	Table des figures	135
	Table des abréviations	137
	Bibliographie	139

Introduction

L'objectif principal de cette thèse est de déterminer les paramètres expérimentaux à prendre en compte afin d'effectuer des études en IRM fonctionnelle (IRMf) chez le rat, en particulier dans le contexte de la stimulation électrique intracérébrale et des nerfs périphériques. Ces manipulations constituent un véritable défi expérimental dans la mesure où la réussite des expériences implique un nombre important de facteurs, dont certains sont liés au vivant : préparation animale, stimulation, anesthésie, imagerie, etc.

La stimulation cérébrale profonde et la stimulation du nerf vague sont des techniques utilisées depuis plusieurs années chez l'homme dans le traitement de la maladie de Parkinson et des épilepsies, et se développent dans un nombre croissant de pathologies pharmacorésistantes. Toutefois, leurs mécanismes d'action sont encore mal compris, et l'IRMf permet d'appréhender les effets de ces stimulations sur le cerveau entier.

La première partie de ce mémoire présentera le contexte général de ma thèse. Je présenterai en détail la technique d'imagerie par résonance magnétique nucléaire couplée à l'électrophysiologie. Puis j'aborderai le cadre physiopathologique des applications cliniques de la stimulation que j'ai pu explorer durant cette thèse : l'épilepsie et les maladies chroniques de l'intestin. Je présenterai aussi l'état de l'art des techniques de stimulation cérébrale profonde et de stimulation du nerf vague, utilisées dans le traitement de ces pathologies.

Ensuite, dans une deuxième partie, j'exposerai les développements méthodologiques nécessaires à l'obtention de cartes statistiques et de connectivité en IRMf du petit animal. Dans un premier temps, je présenterai la méthodologie IRM sous-jacente développée en stage de Master 2 puis terminée au début de ma thèse, ainsi que les traitements statistiques inhérents à la réussite de ces expérimentations, et notamment la modélisation causale dynamique, technique utilisée dans le cadre de l'imagerie fonctionnelle de la stimulation du nerf vague. Puis viendra une étude sur le choix de l'anesthésique à utiliser pour effectuer l'imagerie fonctionnelle du petit animal, mêlant théorie et confrontations expérimentales. Enfin, je présenterai les différents problèmes liés au choix du matériau constituant l'électrode de stimulation pour la stimulation intracérébrale, et expliquerai le choix de l'électrode « fait main » en carbone.

La dernière partie consignera les différents résultats obtenus pendant ma thèse. Je commencerai par présenter des travaux de validation de l'IRMf, dans un premier temps par des mesures de signal BOLD lors de challenges gazeux induisant l'hypercapnie, puis par IRMf de la stimulation du système nerveux périphérique.

Puis, je présenterai les deux articles parus lors de ma thèse. Le premier, pour lequel j'ai développé les séquences IRM ayant permis l'acquisition des données, porte sur le couplage entre IRM fonctionnelle et électroencéphalographie pour l'imagerie des réseaux épileptiques chez le rat, et a permis de valider les mesures de connectivité fonctionnelles par IRMf. Le deuxième article consiste en l'étude par IRM fonctionnelle de la stimulation du nerf vague, technique étudiée par l'équipe 8 du GIN¹ pour son rôle anti-inflammatoire au niveau des intestins.

Enfin, je présenterai les résultats obtenus lors de mes derniers mois de manipulation en imagerie fonctionnelle des réseaux induits par stimulation électrique intracérébrale, qui n'ont qu'un aspect exploratoire.

Pour finir, je terminerai ce manuscrit par une présentation des perspectives de ces travaux de recherche et une conclusion générale sur les aspects méthodologiques auxquels il faut porter une attention particulière pour mener à bien des expériences d'imagerie fonctionnelle chez le petit animal.

1. « Étude du stress et des interactions neurodigestives », dirigée par le Pr. Bonaz.

Première partie

État de l'art

Chapitre 1

L'imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM), s'impose à l'heure actuelle comme la méthode d'imagerie non-invasive la plus utilisée. Elle a connu son essor dans les années 1990, plus de 50 ans après la découverte du principe de la résonance magnétique nucléaire. Bien que le concept d'imagerie par résonance magnétique ait été développé par Paul Lauterburg dès 1973, les limites techniques et technologiques restaient encore trop importantes pour une utilisation routinière. À présent, les perspectives de cette méthode d'imagerie ne cessent de progresser : qui aurait-pu prévoir que l'on puisse, grâce à cette technique, détecter des activations neuronales, ou calculer des concentrations de métabolites de façon totalement non invasive ?¹

Dans ce chapitre nous présenterons tout d'abord les bases physiques de la résonance magnétique nucléaire. Puis, nous verrons comment accéder, grâce à l'IRM fonctionnelle, aux activations neuronales induites par un stimulus quelconque, par le biais du signal BOLD (Blood Oxygen Level Dependant).

1.1 Principe de la résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) a été mise en évidence en 1938 par Isaac Rabi, découverte pour laquelle il obtint le prix Nobel de physique en 1944. La notion de fréquence de résonance a été précisée indépendamment par les physiciens Felix Bloch et Edward Purcell peu de temps après, et ils obtinrent conjointement le prix Nobel en 1952.

1.1.1 Le magnétisme nucléaire

Le noyau des atomes est constitué de protons et de neutrons. Ces particules possèdent un moment cinétique propre, appelé spin cinétique (de l'anglais *to spin*, tourner). On peut imaginer ce moment cinétique correspondre à l'énergie de rotation de ces particules sur elles-mêmes.

Selon le noyau considéré, les spins des différents nucléons peuvent se compenser ou non. On obtient ainsi des atomes ayant des spins nucléaires nuls, ou ayant des valeurs demi-entières. Par exemple, et c'est l'atome qui va principalement nous intéresser, l'hydrogène, qui ne possède qu'un seul proton, a un spin nucléaire $\frac{1}{2}$. En effet, on retrouve cet atome dans une très

1. Pour une revue des techniques les plus avancées en IRM, voir Bammer et al. (2005)

large majorité des composés organiques, et surtout dans l'eau, présente dans les tissus biologiques dans des proportions pouvant aller de 60% à 82 %.

De façon très schématique, on représente généralement le noyau, de spin non nul, comme un aimant microscopique, animé d'un mouvement de rotation de moment cinétique \vec{L} , occasionnant un moment magnétique $\vec{\mu}$ tel que :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{L} \quad (1.1)$$

γ est appelé *rapport gyromagnétique* du noyau, et dépend du noyau considéré.

Par exemple, pour le proton : $\gamma_H = 42.58 \times 2\pi \text{ MHz/T}$.

Cette modélisation classique d'un phénomène évidemment quantique est suffisante pour la plupart des raisonnements qualitatifs en RMN. Pour des phénomènes plus fins ou des ambitions quantitatives, on a bien sûr recours à une vision quantique du noyau. Nous n'aborderons pas la vision quantique de la RMN, la vision classique étant suffisante à la compréhension des propriétés mises en jeu en imagerie cérébrale.

1.1.2 Comportement du noyau d'hydrogène dans un champ statique : la polarisation des spins

À présent, considérons un ensemble mésoscopique de protons, contenus dans ce que nous appellerons par la suite *voxel* (*volume element* : élément de volume). En l'absence de champ magnétique, dans un matériau paramagnétique ces protons présentent des spins de directions aléatoires. Leur somme est donc nulle et, à l'échelle macroscopique, l'échantillon ne présente aucune aimantation.

Lorsqu'un proton est soumis à un champ magnétique externe, généralement appelé \vec{B}_0 , il va entrer en précession² autour de celui-ci. De plus, il y a une levée de dégénérescence des niveaux d'énergie pour les spins parallèles (dans le même sens que \vec{B}_0) et anti-parallèles (dans le sens contraire de \vec{B}_0), ces derniers étant plus énergétiques. Ensuite, par le jeu des fluctuations thermodynamiques, les protons vont lentement s'orienter de manière à minimiser leurs énergies, c'est-à-dire parallèlement au champ \vec{B}_0 , à des échelles de temps de l'ordre de la seconde.

Il en résulte une aimantation macroscopique \vec{M}_0 , orientée dans la direction de \vec{B}_0 , qui, à l'équilibre thermodynamique, est donnée par :

$$\vec{M}_0 = \rho \chi \vec{B}_0 = \frac{\rho \mu^2}{4k_B T} \vec{B}_0 \quad (1.2)$$

où χ est la susceptibilité magnétique du milieu considéré, ρ est la densité de spins, k_B la constante de Boltzmann et T la température de l'échantillon.

2. Le mouvement de précession est le mouvement de rotation autour d'un axe fixe d'un objet lui-même en rotation autour d'un axe propre. On citera par exemple le mouvement lent d'une toupie autour de l'axe vertical lorsqu'elle commence à s'en écarter. Ce phénomène est propre aux gyroscopes. On emploiera par la suite le verbe « précesser ».

En présence du champ \vec{B}_0 , *chaque* spin est animé d'un mouvement de précession (cf. figure 1.1) *autour* du champ à la fréquence f , appelée fréquence de Larmor, donnée par la relation :

$$f = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (1.3)$$

Ces manifestations sont très subtiles, et les différences de population entre les deux niveaux sont très faibles : à température ambiante, et pour un champ magnétique de 1,5 T, seul un noyau d'hydrogène sur 10^5 contribue à l'aimantation.

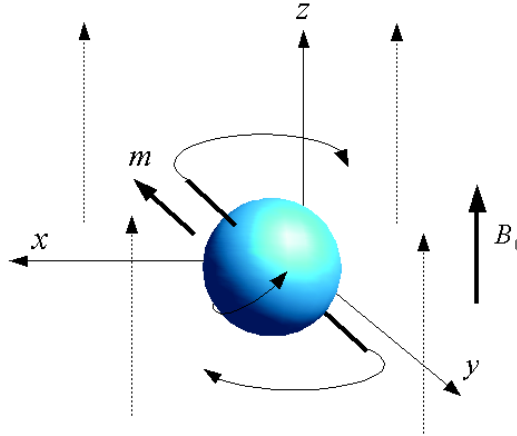


FIGURE 1.1 – Noyau précessant dans un champ magnétique statique \vec{B}_0 .

1.1.3 Application d'un champ radiofréquence : phénomène de résonance

On a vu que la fréquence de précession des spins était définie par le champ \vec{B}_0 et le type de noyau. Si l'on applique un champ radiofréquence (RF) \vec{b}_1 à la fréquence de Larmor, dans une direction transversale à \vec{B}_0 , on peut faire rentrer ces atomes en résonance, et alors les faire *basculer* de leur position d'origine.

Pour comprendre ce phénomène, il convient d'introduire le concept de *repère tournant* : on se place dans un repère tournant autour de \vec{B}_0 à la fréquence de Larmor. Ainsi, les spins, qui précessaient dans notre repère galiléen d'origine, semblent immobiles dans le repère tournant. De même, dans ce repère tournant le champ \vec{b}_1 semble être un champ statique appliqué perpendiculairement à \vec{B}_0 (cf. figure 1.2).

Au niveau macroscopique, l'application de \vec{b}_1 occasionne un basculement de l'aimantation macroscopique \vec{M}_0 . L'angle de basculement dépend de l'amplitude du champ RF, ainsi que de la durée d'application du champ. La durée d'application du champ étant généralement courte (de l'ordre de la milliseconde), on parle d'*impulsion radiofréquence*. On la caractérise par l'angle de basculement Ψ qu'elle occasionne.

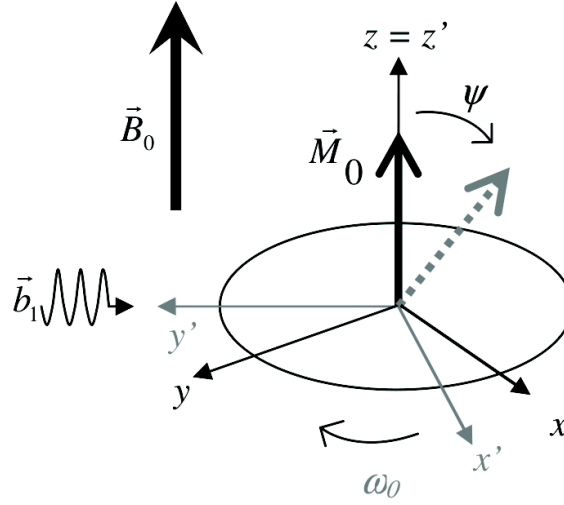


FIGURE 1.2 – Sous l'effet d'une impulsion radiofréquence \vec{b}_1 , pour un observateur placé dans le repère tournant à la fréquence de Larmor ω_0 , l'aimantation est basculée vers le plan transverse d'un angle Ψ .

1.1.4 Temps de relaxation

Dès l'arrêt de l'impulsion RF, l'aimantation macroscopique possède une composante transversale, que l'on capte à l'aide d'antennes RF. Cette composante transversale subit alors une décroissance caractéristique.

Ce retour à l'équilibre suit l'équation de Bloch (cf. équation 1.4), qui décrit les variations temporelles de deux processus de relaxation. L'un correspond au retour de l'aimantation suivant la direction de \vec{B}_0 , tandis que l'autre correspond à une perte de cohérence des différents spins de l'échantillon. Ces deux phénomènes possèdent des temps caractéristiques nommés respectivement T_1 et T_2 .

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \wedge \gamma \vec{B} - \frac{M_x \vec{i} + M_y \vec{j}}{T_2} + \frac{(M_0 - M_z) \vec{k}}{T_1} \quad (1.4)$$

Equation de Bloch décrivant le comportement de l'aimantation macroscopique sous un champ statique suivant la direction \vec{z} avec \vec{i} , \vec{j} et \vec{k} vecteurs unitaires des axes x , y et z , respectivement.

Le temps T_1 correspond à la relaxation *longitudinale* ou *spin-réseau* et caractérise la vitesse à laquelle l'aimantation \vec{M} revient à l'équilibre \vec{M}_0 . Ceci traduit un échange énergétique entre les spins et leur environnement. Pour un angle de basculement Ψ de 90 deg, l'aimantation longitudinale M_z croît au cours du temps de zéro vers M_0 selon l'équation :

$$M_z = M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}} \right) \quad (1.5)$$

Le temps T_2 correspond à la relaxation *transversale* ou *spin-spin* et caractérise la vitesse à laquelle l'aimantation transversale macroscopique M_{xy} s'annule, à cause de la perte de cohérence de phase des spins. Pour un angle de basculement Ψ de 90° , l'aimantation transversale décroît de M_0 à zéro selon l'équation :

$$M_{xy} = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (1.6)$$

En fait cette équation cache deux phénomènes différents ayant le même comportement macroscopique : une perte de cohérence quantique des spins au cours du temps, définitive, et une perte de cohérence due aux inhomogénéités de champ.

En effet, au sein d'un voxel le champ n'est pas parfaitement constant spatialement. Ceci implique que les spins se trouvant à des endroits différents vont précesser de manière différente, de par l'équation 1.3. Ils vont donc progressivement se déphaser, et leur valeur moyenne va diminuer. Ce dernier phénomène a un temps caractéristique noté T_2^* , et est réversible par retournement des spins grâce à une impulsion de 180° . Bien entendu, on a $T_2^* < T_2$.

De manière générale, ces temps caractéristiques ont un rôle fondamental en IRM, étant à la base du contraste de l'image (cf. figures 1.3 et 1.4).

Temps de relaxation	Eau pure	Matière grise	Matière blanche
T_1	2700 ms	1090-2150 ms	760-1080 ms
T_2	2600 ms	60-110 ms	60-100 ms

FIGURE 1.3 – Ordres de grandeur de quelques temps de relaxation caractéristiques

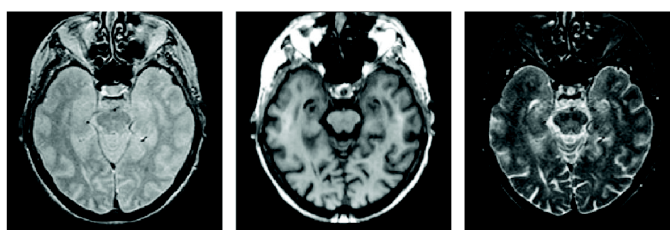


FIGURE 1.4 – Images d'une même coupe de cerveau humain, pondérées en densité de protons (à gauche), en T_1 (au milieu) et en T_2 (à droite) (d'après Warnking (2002))

1.2 Principe de l'IRM

Dans un premier temps, nous verrons comment exciter une tranche seulement de l'échantillon à imager. Ensuite nous aborderons les bases de l'encodage spatial, en introduisant la notion d'espace réciproque. Enfin je présenterai brièvement la principale séquence utilisée en IRM fonctionnelle, l'Echo Planar Imaging (EPI).

1.2.1 Sélection de tranche

Pour exciter une coupe d'épaisseur Δe dans la direction \vec{z} , une impulsion RF modulée en amplitude est appliquée en présence d'un gradient de champ magnétique G_z . L'impulsion RF, modulée en amplitude en sinus cardinal, a un profil rectangulaire dans le domaine fréquentiel dont le centre correspond à la fréquence d'excitation. Cette impulsion peut donc exciter tous les spins dont la fréquence est comprise dans la largeur de bande de son profil $\Delta\omega$ ³ (cf. figure 1.5).

En présence d'un gradient de champ magnétique dans la direction \vec{z} , la fréquence des spins varie linéairement dans la direction \vec{z} , de sorte que seuls les spins situés dans une tranche perpendiculaire à l'axe \vec{z} possèdent une telle fréquence, et sont donc excités par l'impulsion RF : on obtient ainsi une excitation spatialement sélective, c'est la sélection de tranche ou sélection de coupe.

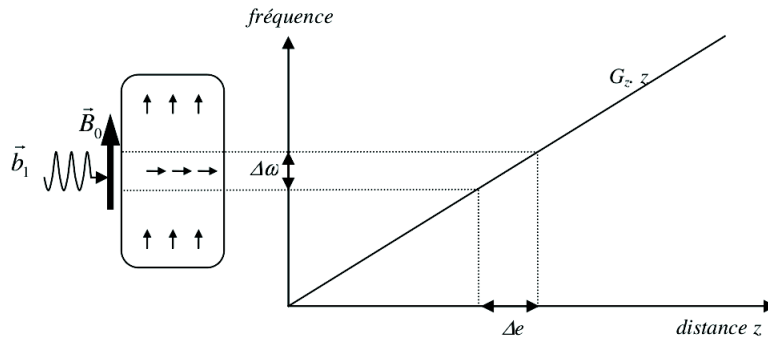


FIGURE 1.5 – Schéma de la sélection de tranche par application simultanée d'une impulsion RF sélective et d'un gradient de sélection de tranche. L'épaisseur de la tranche est donnée par : $\Delta e = \frac{\Delta\omega}{\gamma G_z}$.

1.2.2 Encodage spatial

Une fois le signal RMN constitué, on encode spatialement les noyaux pour former une image. Ceci est réalisé à l'aide de gradients de champ magnétique. En effet, l'équation 1.3 montre que si l'on applique un tel gradient, le champ vu par les noyaux peut s'écrire :

$$B_z(\vec{r}) = \vec{G} \cdot \vec{r} + B_0 = f/\gamma \quad (1.7)$$

3. La résonance magnétique du proton soumis à un champ RF étant d'origine quantique, la gamme de fréquence résonante est très étroite, et peut presque être considérée comme nulle

où \vec{G} représente le gradient appliqué, \vec{r} la position du noyau correspondant, et B_0 le champ statique (supposé homogène) appliqué avant l'introduction du gradient.

On remarque alors que la relation entre la position du noyau et la fréquence à laquelle il précesse est linéaire.

Lorsqu'un gradient est appliqué, par exemple selon \vec{x} , l'intensité du signal RMN à chaque fréquence reflète donc la densité des noyaux projetée selon \vec{x} .

1.2.3 Signal RMN en présence de gradients de champ magnétique

1.2.3.1 Espace-k

Le signal enregistré lors d'une expérience IRM 2D est exprimé dans un espace fréquentiel à deux dimensions : l'*espace-k*. Cet espace est caractérisé par deux coordonnées k_x et k_y . Elles correspondent aux fréquences spatiales de l'image que l'on cherche à acquérir. Nous verrons plus bas comment une application judicieuse de gradients à l'échantillon nous permet de remplir cet espace-k.

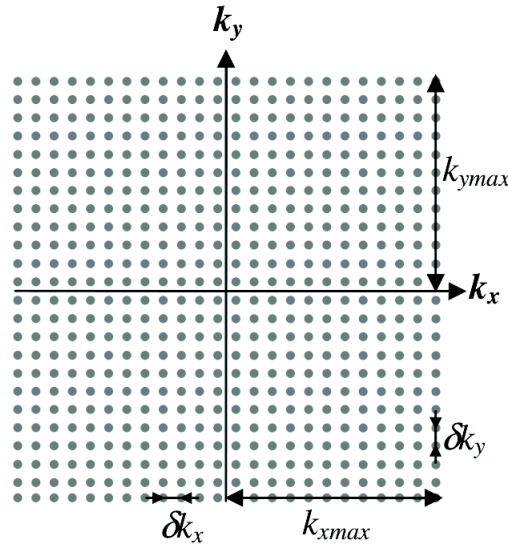


FIGURE 1.6 – Espace-k ou espace réciproque : δk_x et δk_y représentent la résolution de la fréquence spatiale. k_{xmax} et k_{ymax} représente les valeurs maximales atteintes

La figure 1.6 représente une grille d'échantillonnage cartésienne dans l'espace-k. Les caractéristiques de l'image reconstruite par 2DFT⁴ à partir de l'espace-k sont directement liées aux paramètres explicités sur la figure 1.6.

En effet, le champ de vue (FOV : *field of view*) et la résolution spatiale δ de l'image sont donnés par les équations 1.8 et 1.9.

4. Transformée de Fourier à 2 dimensions, permettant d'obtenir une image à deux dimensions dans le domaine spatial à partir d'un plan de Fourier contenant les informations fréquentielles.

$$\text{FOV}_x = \frac{1}{\delta k_x} \quad \text{et} \quad \text{FOV}_y = \frac{1}{\delta k_y} \quad (1.8)$$

$$\delta_x = \frac{1}{2k_{x\max}} \quad \text{et} \quad \delta_y = \frac{1}{2k_{y\max}} \quad (1.9)$$

1.2.3.2 Déplacement dans l'espace réciproque

Après l'excitation RF, tous les spins nucléaires de l'échantillon précessent à la même vitesse et en phase⁵, à condition que le champ statique soit uniforme et invariant. Comme mentionné ci-dessus, en imagerie on se sert de gradients de champ pour *convertir* la position en fréquence. Lorsqu'un tel gradient est appliqué, les spins se trouvant le long de l'axe du gradient se mettent à précesser à des vitesses différentes, et commencent à se déphaser.

Le signal RMN temporel représente alors les fréquences spatiales de l'objet et dépend des variations dans le temps des gradients appliqués. En fait, sous l'application d'un gradient, tout se passe comme si on se déplaçait dans un espace de Fourier à 2D (ou à 3D pour certaines séquences RMN), espace réciproque de l'image souhaitée (figure 1.6) :

$$k_x(t) = \frac{\gamma}{2\pi} \int_0^t G_x(t') dt' \quad \text{et} \quad k_y(t) = \frac{\gamma}{2\pi} \int_0^t G_y(t') dt' \quad (1.10)$$

Ainsi, la direction du gradient correspond à la direction de déplacement, et la force du gradient à la vitesse de déplacement.

Si $f(x, y)$ représente la densité de l'objet, et $F(k_x, k_y)$ sa transformée de Fourier, qui correspond à l'intensité aux fréquences spatiales k_x et k_y , on a :

$$F(k_x, k_y) = \iint f(x, y) \cdot e^{2\pi j(k_x x + k_y y)} dx \cdot dy \quad (1.11)$$

L'application d'un gradient équivaut alors à multiplier $f(x, y)$ par un terme de déphasage :

$$\begin{aligned} F(k_x, k_y) &= \iint f(x, y) \cdot e^{2\pi j \cdot \gamma \vec{G} \cdot \vec{r} \cdot t} \cdot e^{2\pi j(k_x x + k_y y)} dx \cdot dy \\ &= \iint f(x, y) \cdot e^{2\pi j((k_x + \gamma G_x t)x + (k_y + \gamma G_y t)y)} dx \cdot dy \end{aligned} \quad (1.12)$$

ce qui revient d'après l'équation 1.11 à effectuer une translation dans l'espace réciproque de $\gamma t \cdot \vec{G} \cdot \vec{r}$. Une fois l'espace-k acquis, on retrouve alors l'image de la tranche par transformée de Fourier inverse :

$$f(x, y) = \iint F(k_x, k_y) \cdot e^{-2\pi j(k_x x + k_y y)} dk_x \cdot dk_y \quad (1.13)$$

L'imagerie RMN consiste donc en un jeu de séquences permettant de remplir l'espace réciproque de plusieurs manières, en une ou plusieurs excitations.

5. En réalité les noyaux de la tranche excitée ne voyant pas le même champ lors de l'excitation, il faut rephaser les spins après l'excitation, mais nous ne développerons pas ce point.

1.2.3.3 Remplissage de l'espace réciproque

Par la suite, nous considérerons que la sélection de tranche se fait selon \vec{z} , que \vec{x} sera la direction de lecture, et \vec{y} la direction de phase. Nous garderons toutefois à l'esprit qu'un simple changement de repère ne restreint pas la généralité du problème.

Imagerie conventionnelle En imagerie conventionnelle, on acquière généralement une ligne à la fois : la figure 1.7 montre comment cela est effectué. Un premier déplacement est effectué dans l'espace réciproque grâce à un gradient de déphasage, et l'acquisition se fait pendant l'application d'un gradient selon \vec{x} (d'où les dénominations de gradient de lecture et de direction de lecture).

Echo Planar Imaging (EPI) Comme le montre la figure 1.8, la séquence Echo Planar Imaging permet d'acquérir tout l'espace réciproque en une seule excitation. Les subtilités expérimentales de cette séquence et les défauts qu'elle comporte seront largement étudiés dans la suite de ce manuscrit (cf. 4.2).

Autres séquences d'imagerie rapide D'autres séquences existent en IRM pour obtenir des images de volumes entiers de cerveau dans des temps de l'ordre de la seconde. Toutefois, ces séquences sont peu utilisées en imagerie fonctionnelle, notamment car l'EPI reste la meilleure approche, grâce à sa forte sensibilité aux variations de champ magnétique occasionnés par l'effet BOLD (cf 1.9). Pour un exposé de ces séquences d'imagerie rapide et leur comparaison à l'EPI, voir Nitz (2002).

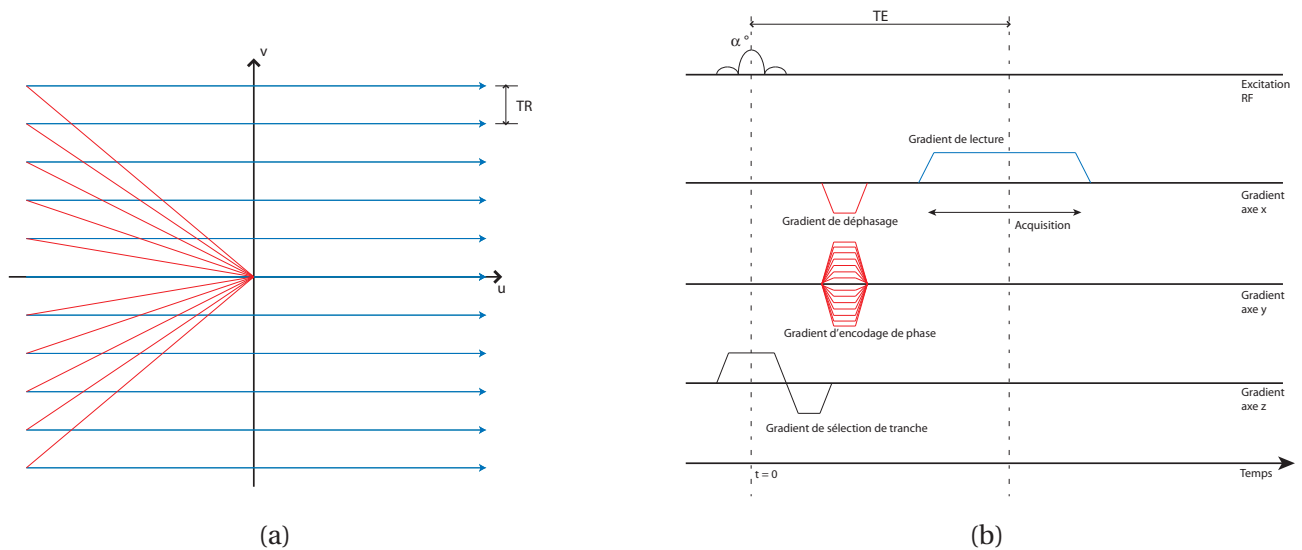
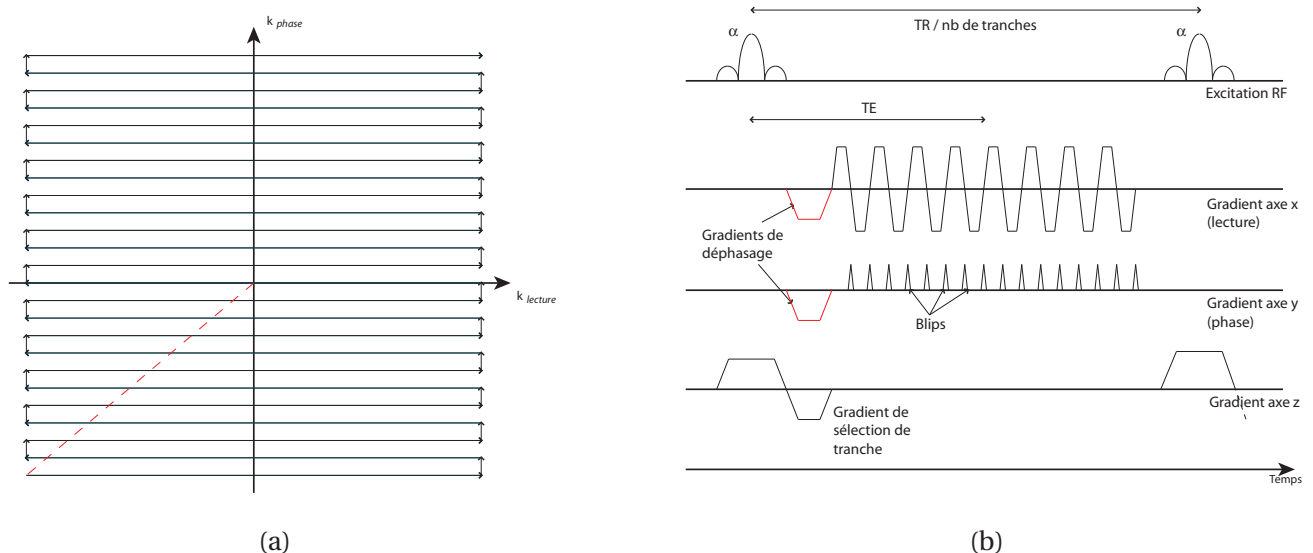


FIGURE 1.7 – Séquence classique RMN en écho de gradient :

(a) Remplissage de l'espace-k en imagerie conventionnelle. En rouge on observe le déphasage et en bleu la ligne parcourue lors de l'acquisition. Chaque ligne est séparée par un TR (temps de répétition).

(b) Séquence de gradients correspondante : après la sélection de tranche, on applique un gradient de déphasage (en rouge), puis on effectue l'acquisition pendant l'application d'un gradient de lecture (en bleu).

FIGURE 1.8 – (a) Remplissage de l'espace-k en Echo Planar Imaging : on balaye le plan de Fourier de la gauche vers la droite et de la droite vers la gauche, en incrémentant k_{phase} à chaque fin de ligne. On peut acquérir en moins de 100 ms une image entière.

(b) La séquence de gradients correspondante : dans la direction de lecture l'espace réciproque est « balayé », et dans la direction de phase on avance par petits pas (blips), après s'être placé dans un coin de l'espace-k une fois la tranche sélectionnée.

1.3 L'IRM fonctionnelle

1.3.1 Principe physiologique

L'IRM fonctionnelle permet d'étudier le fonctionnement du cerveau en observant les modifications locales d'oxygénation sanguine associées à la réalisation d'une activité spécifique. La technique la plus courante utilise l'effet *blood oxygenation level dependent* (BOLD), qui repose sur les variations de débit et de flux sanguins, et sur les propriétés magnétiques de l'hémoglobine (Ogawa et al. (1990a)).

En effet, les molécules d'hémoglobine, qui transportent l'oxygène depuis les poumons jusqu'aux différents organes, peuvent être rencontrées sous deux formes : l'oxyhémoglobine (HbO_2) et la désoxyhémoglobine (dHb). L' HbO_2 , qui transporte les molécules d'oxygène, a des propriétés diamagnétiques comme la plupart des tissus biologiques, alors que la dHb, dépourvue d'oxygène, est paramagnétique. Le contraste BOLD va ainsi permettre d'observer les variations hémodynamiques engendrées par l'activité neuronale.

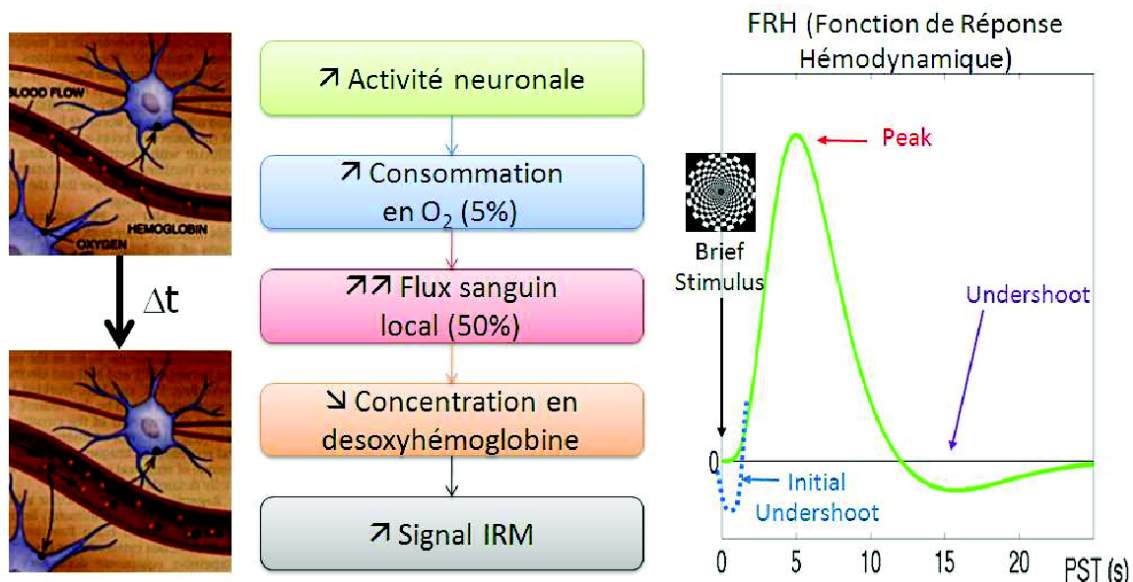


FIGURE 1.9 – Principe de l'effet BOLD.

À gauche : Augmentation du débit sanguin cérébral local par vasodilatation.

Au centre : Processus à l'origine du signal BOLD.

À droite : Fonction de réponse hémodynamique (PST : post-stimulus time).

D'après Grouiller (2008)

Comme le montre la figure 1.9, lors de l'activation d'une population neuronale, le besoin en oxygène de ces neurones est plus important. Cette modification de la consommation en oxygène entraîne une augmentation locale du flux sanguin par vasodilatation, plus importante que l'accroissement de la consommation en oxygène. Ce découplage entre les variations du débit sanguin et la consommation en oxygène engendre une diminution de la concentration en dHb dans les régions activées. Ce processus provoque une modification de la susceptibilité

magnétique et donc une augmentation du signal RMN enregistré⁶. (Logothetis (2002))

Toutefois, cette évolution n'est pas instantanée et la variation de signal BOLD n'est qu'un effet indirect de l'activation neuronale. La variation de signal BOLD associée à une stimulation ponctuelle peut être modélisée par la fonction de réponse hémodynamique (FRH) (Buxton et al. (1998) ; Martindale et al. (2003)). Cette fonction est l'équivalent de la réponse impulsionnelle d'un filtre linéaire et caractérise les processus hémodynamiques mis en jeu.

Afin d'étudier les variations hémodynamiques au cours du temps, il est nécessaire de répéter rapidement des acquisitions du volume cérébral. C'est pourquoi la séquence présentée en 4.2, l'Echo Planar Imaging (EPI), est très largement utilisée en IRMf. En effet, cette séquence permet d'avoir des images entières du cerveau pondérées en T_2^* en seulement une à trois secondes.

1.3.2 Utilisations courantes chez l'homme

L'IRM fonctionnelle est une technique jeune, qui n'a été rendue technologiquement possible que très récemment. La première réussite a eu lieu en 1991, où une augmentation localisée du flux sanguin cérébral a été détectée dans le cortex visuel, en réponse à un stimulus visuel. (Belliveau et al. (1991)) Depuis ce jour, de nouvelles applications de l'IRMf n'ont cessé d'apparaître.

En recherche, la technique est utilisée pour des applications allant de la psychologie cognitive jusqu'à l'étude de diverses pathologies.

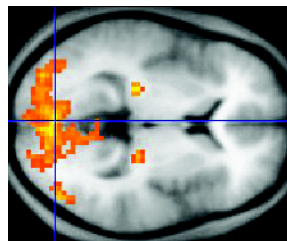


FIGURE 1.10 – Détection par IRMf de l'activation des régions du cerveau impliquées dans la perception visuelle

L'IRMf est aussi utilisée en clinique, généralement dans le cadre d'investigations préopératoires, afin de déterminer l'emplacement d'un certain nombre de zones fonctionnelles chez le patient. Cet examen aide le neurochirurgien à évaluer les risques, voire la faisabilité d'une opération, et à préparer son geste. Même si il existe des aimants permettant des scans peropératoires, leur utilisation reste anecdotique en IRMf.

6. En effet, la présence de dHb augmente considérablement les inhomogénéités de champ magnétique dans le tissu environnant, entraînant une diminution du temps caractéristique T_2^* . (cf. 1.1.4)

1.3.3 Avantages et inconvénients de l'IRMf

De par l'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique, l'IRMf a une bonne résolution spatiale, et permet l'obtention d'images sans aucune exposition à des rayonnements ionisants, et sans injection de produit de contraste. Elle devient alors un élément de choix pour des examens de routine, par opposition à des examens plus invasifs comme le scanner à rayons X ou la tomographie par émission de positrons (TEP).

Toutefois, la technique présente deux inconvénients majeurs : l'environnement magnétique incombant à l'IRM et sa faible résolution temporelle.

a. L'environnement magnétique interdit les examens sur une partie de la population, notamment pour les patients ayant des objets métalliques à l'intérieur du corps. Ceci pose particulièrement problème pour l'observation des conséquences de la stimulation électrique intracérébrale, où la présence de corps conducteurs à l'intérieur du crâne du patient pose des problèmes de sécurité. (cf. Carmichael et al. (2007) et section 6.1)

b. Les techniques IRM actuelles permettent de créer des images T_2^* en des temps passant difficilement sous la seconde. Comme le phénomène observé a un temps caractéristique d'une dizaine de secondes, la résolution temporelle est suffisante. Mais pour détecter des activités neuronales, la technique ne pourra pas rivaliser avec d'autres méthodes, notamment l'électroencéphalographie (EEG), qui permet un échantillonnage du signal à recueillir à plusieurs kHz. Toutefois, l'EEG est lourdement pénalisée par une résolution spatiale très faible, et les études électroencéphalographiques sont le plus souvent limitées au cortex. Nous verrons en 2.1.7 qu'il peut être intéressant de coupler ces deux techniques.

1.3.4 Travaux en imagerie fonctionnelle chez le petit animal

L'IRM a révolutionné l'imagerie cérébrale chez l'homme. L'apparition d'aimants IRM à haut champ pour petit animal, avec des fourreaux destinés aux rats et souris, a rendu possible la transposition de ce champ prometteur aux études sur petits animaux, dans le cadre de recherches précliniques sur des molécules ou d'autres approches invasives (fig. 1.11).

Cependant, l'utilisation de l'IRMf chez le petit animal est particulièrement délicate, car celle-ci nécessite l'immobilité de l'animal. Il existe des études sur animaux conscients (Lahti et al. (1998, 1999); Khubchandani et al. (2003); Khubchandani and Jagannathan (2004); Tenney et al. (2003, 2004); King et al. (2005); Ferris et al. (2006); Desai et al. (2011)), mais le stress engendré par les conditions expérimentales (fort bruit de l'IRM, matériel de surveillance physiologique, etc.) pose problème. La plupart des expérimentations en IRMf sur petit animal se déroule donc sur animal anesthésié, ce qui constitue un défi à relever, du fait de l'action de l'anesthésie sur l'activité neuronale et sur le couplage neuro-vasculaire. C'est un point crucial qui n'est pas encore résolu à l'heure actuelle, sur lequel nous reviendrons largement dans les développements méthodologiques (chapitre 5).

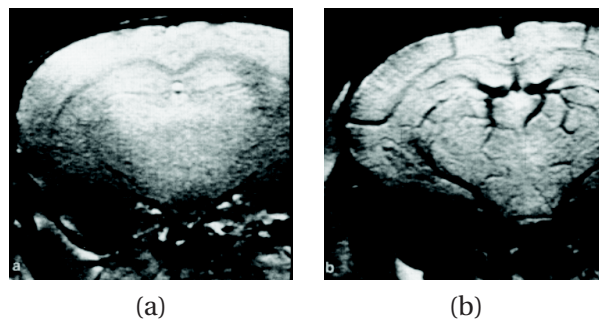


FIGURE 1.11 – Coupes coronales de cerveau de souris acquises avec une séquence en écho de gradient : effet de l'oxygénation du sang sur le contraste IRM.

(a) : La souris respire de l'oxygène pur ; peu de vaisseaux sont visibles.

(b) : La souris respire de l'air (20 % d'O₂) ; la désoxygénation du sang rend de multiples vaisseaux visibles. D'après Ogawa et al. (1990b)

Chapitre 2

Cadre physiopathologique des applications cliniques explorées

L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a développé l'IRM fonctionnelle sur un modèle d'épilepsie (le rat GAERS, cf. 8.3), dans le cadre du développement des techniques d'imagerie fonctionnelle préchirurgicale. L'objectif, chez le rat, fut de valider la méthode d'IRMf couplée à l'électroencéphalographie (EEG), et a permis par la même occasion de s'intéresser au couplage neuro-vasculaire, possiblement altéré dans les pathologies épileptiques.

De plus, la stimulation cérébrale profonde (SCP) est devenue un des éléments prépondérants de l'arsenal thérapeutique des épilepsies pharmacorésistantes (Saillet et al. (2009)), et il a paru intéressant d'étudier les effets à distance de la SCP grâce à l'IRMf.

D'autre part, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe 8 de Stress et interactions neurodigestives, dirigée par le professeur Bruno Bonaz, nous avons cherché à étudier les effets centraux de la stimulation du nerf vague (cf. chapitre 9), utilisée par l'équipe 8 pour ses effets anti-inflammatoires périphériques dans un modèle de colite chez le rat. L'objectif de leurs travaux est d'utiliser la stimulation du nerf vague chez l'homme dans le traitement des maladies chroniques de l'intestin (MICI), dont les essais cliniques sont en cours.

Dans ce chapitre, je présenterai donc ce qu'il faut connaître de ces deux pathologies, épilepsie et MICI, puis je présenterai en détail l'état de l'art des différentes techniques de stimulation électrique dans le prochain chapitre.

2.1 Épilepsie

2.1.1 Présentation de la maladie et définitions

L'épilepsie est un trouble neurologique causé par un dysfonctionnement passager de l'activité électrique cérébrale. Lors d'une crise d'épilepsie, les neurones produisent soudainement une décharge électrique anormale de forte amplitude (paroxystique) dans certaines zones cérébrales. C'est une maladie qui reste méconnue du grand public, de par la caricature exposée dans les médias, où l'épilepsie est le plus souvent associée à des convulsions soudaines et impressionnantes. Pourtant, l'épilepsie ne se limite pas à ces crises tonico-cloniques et peut prendre bien d'autres formes.

Une crise d'épilepsie est définie comme « la survenue transitoire de signes et/ou de symptômes dus à une activité neuronale cérébrale excessive ou anormalement synchrone » (Fisher et al. (2005)). Selon la région cérébrale affectée, la crise peut avoir des manifestations cliniques très différentes : contractions toniques, secousses cloniques, absences, troubles sensitifs, sensoriels ou psychiques. Une crise d'épilepsie n'est pas toujours accompagnée d'une perte de connaissance.

Quant à la maladie *épilepsie*, elle est définie comme étant la répétition, chez un même sujet, de plusieurs crises d'épilepsie spontanées. L'épilepsie est dite active si le patient a eu au moins une crise au cours des cinq dernières années.

2.1.2 Épidémiologie

Prévalence L'épilepsie est l'affection neurologique la plus fréquente après la migraine et concerne, en France, près de 1 % de la population. L'épilepsie dans ses différentes formes touche près de 50 millions de personnes dans le monde, nourrissons, enfants, adolescents et adultes confondus.

Incidence On recense 53 cas pour 100 000 habitants et par an (30 000 nouveaux cas en France tous les ans). La durée moyenne calculée de la maladie est de 6 à 10 ans.

L'allongement de l'espérance de vie accroît le risque d'apparition, chez les personnes âgées, de crises d'épilepsie liées à des accidents cérébrovasculaires ou à des maladies dégénératives. Ainsi, 5 % des octogénaires ont déjà subi une crise d'épilepsie.

2.1.3 Neurophysiopathologie

L'épilepsie est un dysfonctionnement cérébral se traduisant par une activité électrique anormale d'une population de neurones. Deux propriétés caractérisent les neurones responsables de cette activité paroxystique :

- **l'hyperexcitabilité** : génération de décharges répétées en réponse à une stimulation qui ne provoque habituellement qu'un seul potentiel d'action ;
- **l'hypersynchronie** : génération synchrone de trains de potentiels d'action par un groupe de neurones.

Ces particularités semblent être liées à des anomalies biochimiques qui altèrent les propriétés des membranes neuronales, créant ainsi un déséquilibre entre excitation et inhibition. Ce mécanisme pourrait être à l'origine de la dépolarisation paroxystique massive d'une large population de neurones qui peut s'étendre très rapidement aux régions avoisinantes, mais aussi à des régions corticales plus distantes en empruntant les voies de projections associatives.

2.1.4 Les différentes crises d'épilepsie

Même si les manifestations cliniques d'une crise varient énormément d'un patient à l'autre, chez un même individu les crises sont généralement semblables. On a coutume de dire qu'il y a autant d'épilepsies que de patients épileptiques. Cependant, on peut tout de même effectuer un classement des différents types d'épilepsie rencontrés.

Parmi les crises généralisées, on distingue généralement les crises tonico-cloniques (ou « Grand Mal ») et les crises d'absence (ou « Petit Mal »).

2.1.4.1 Crises tonico-cloniques

Elle représente la forme la plus spectaculaire de crise d'épilepsie. Le patient perd brutalement connaissance et son organisme présente des manifestations évoluant en trois phases :

- Phase tonique : raidissement, contraction de l'ensemble des muscles des membres, du tronc et du visage dont les muscles oculomoteurs et masticateurs ;
- Phase clonique : convulsions, contractions désordonnées des mêmes muscles ;
- Récupération : phase d'inconscience (coma durant quelques minutes à quelques heures), caractérisée par une respiration bruyante due à l'encombrement bronchique.

Le retour à la conscience est progressif, il existe souvent une confusion post-critique et l'absence de souvenir de la crise.

2.1.4.2 Épilepsie absence

Les absences représentent une forme fréquente d'épilepsie et concernent quasiment exclusivement les enfants (jusqu'à la puberté). Elles se manifestent par une perte brusque du contact avec regard vague, aréactivité aux stimuli, phénomènes cloniques (clignement des paupières, spasmes de la face, mâchonnements), parfois toniques (raidissement du tronc) ou végétatifs (perte d'urines, hypersalivation). Dans les absences typiques, la perte de conscience et le retour à la conscience sont brutaux, l'absence durant quelques secondes.

Elles sont contemporaines d'une activité EEG caractéristique : elles présentent des pointes-ondes de 3Hz, bilatérales, symétriques et synchrones (figure 2.1). Les absences peuvent se répéter 10 à 100 fois par jour en l'absence de traitement.

Nous présenterons en 8.3 un modèle animal de l'épilepsie absence, le GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg).

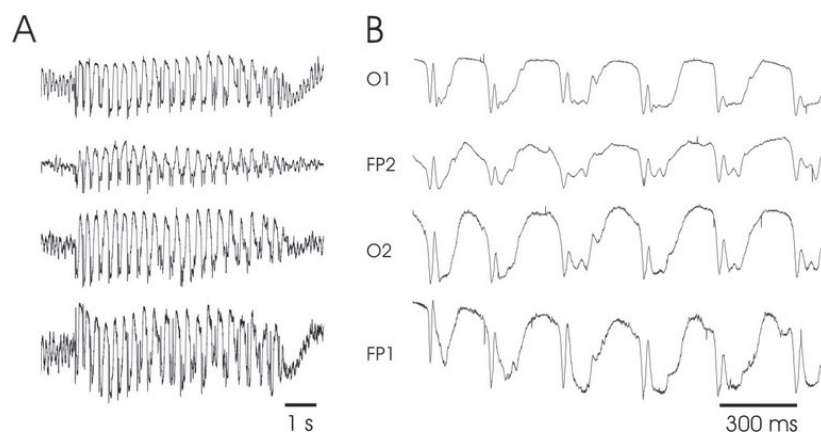


FIGURE 2.1 – Electroencéphalogramme (EEG) d'un enfant de 10 ans lors d'une crise d'absence, présentant des oscillations lentes (3 Hz environ).

Les lignes correspondent aux différentes électrodes de mesure.

A – Totalité de la crise. On remarque nettement le début et la fin de la crise.

B – Agrandissement de l'EEG A. On voit apparaître les décharges de pointe-onde caractéristiques d'une crise d'absence.

D'après Destexhe (1992)

2.1.4.3 Crises partielles

Les crises partielles affectent initialement une zone cérébrale restreinte, appelée zone épileptogène, limitée à un seul hémisphère. L'activité paroxystique observée lors des crises focales peut rapidement se propager à d'autres régions cérébrales et parfois se généraliser.

Les manifestations cliniques observées pendant une crise partielle peuvent être très différentes selon les régions cérébrales impliquées. L'observation de la succession des différents signes cliniques permet souvent de révéler la localisation initiale et le schéma de propagation de l'activité épileptique. Les principales manifestations cliniques qui peuvent survenir sont :

- des troubles moteurs,
- des troubles somato-sensoriels, des hallucinations ou des vertiges,
- des symptômes cognitifs ou psychiques : dysphasie, sensation de déjà-vu, ...

Toutefois, ces considérations ne suffisent pas à repérer de façon suffisamment précise la zone épileptogène, notamment en vue de traitements chirurgicaux, et on doit avoir recours à des techniques employant généralement l'électroencéphalographie.

2.1.5 Diagnostic : principe de l'électroencéphalographie (EEG)

L'électroencéphalographie (EEG) consiste à mesurer l'activité *électrique* du cerveau en recueillant des différences de potentiel électrique entre des électrodes placées à la surface du crâne.

Le phénomène à la base de l'EEG est le potentiel d'action post-synaptique émis par les neurones. Comme le signal d'un neurone est trop faible pour être détecté à distance, on est borné, en EEG, à détecter de larges populations de neurones. Ce sont donc des groupements de neurones présentant des potentiels d'action post-synaptique synchrones que l'on va étudier en EEG.

Ceci implique une résolution spatiale très faible, et bien que des techniques de détection de sources EEG existent, par exemple par inversion des équations de Maxwell, il faut coupler cette technique avec d'autres si l'on souhaite une bonne caractérisation spatiale des phénomènes observés.

Les avantages de l'EEG résident dans sa simplicité d'utilisation, son faible coût et son excellente résolution temporelle. En effet, les signaux sont généralement échantillonnés à plusieurs kHz, ce qui est plus que suffisant pour l'étude des ondes corticales, qui, une fois sommées, excèdent rarement la centaine de Hz.

L'EEG est particulièrement adaptée à l'étude de l'activité épileptique, laquelle est justement occasionnée par de larges populations de neurones déchargeant de façon synchrone.

On citera aussi la stéréo-électroencéphalographie (SEEG), qui, à l'aide d'électrodes de mesure implantées de façon intracérébrale, permet des mesures beaucoup plus fines de l'activité cérébrale. Elle permet l'observation de fréquences plus importantes qu'en EEG de scalp, ces fréquences disparaissant une fois moyennées sur une grande population de neurones. De plus,

la SEEG permet d'observer les zones profondes du cerveau, alors que l'EEG de scalp se limite au cortex.

La SEEG est utilisée en clinique pour les évaluations préchirurgicales dans certaines épilepsies. Bien entendu, cette technique est handicapée par sa forte invasivité, et se borne à l'observation des neurones autour de l'électrode.

2.1.6 Traitements médicamenteux et chirurgicaux

Le traitement médical est satisfaisant pour environ 70 % des patients (Kwan and Brodie (2000)). De nombreuses molécules ont été découvertes à l'heure actuelle, et sont utilisées seules ou en bi- ou trithérapie. Leur mécanisme tend à stabiliser la membrane cellulaire pour réduire le nombre de potentiels d'action répétés en réponse à une excitation et pour éviter l'hyper-synchronisation. La plupart d'entre eux ont un effet GABA-mimétique direct ou indirect qui conduit à la régulation de l'ouverture ou de l'inhibition des canaux ioniques de type chlorure ou sodium. Toutefois, ces médicaments présentent des effets secondaires handicapants tels que vertiges, confusions mentales, nausées, somnolences, etc. Certains d'entre eux peuvent entraîner une dépendance lors d'un usage prolongé.

De plus, un certain nombre de patients présentent une pharmacorésistance et continuent à subir des crises, même sous traitement. Pour certains de ces patients, une approche chirurgicale est possible. Elle s'opère généralement par résection¹ du foyer épileptogène, si tant est que ce foyer soit suffisamment bien localisé. Si le foyer est proche d'une aire fonctionnelle essentielle, le rapport bénéfice/risque doit être évalué. Ces contraintes font que, parmi ces patients « pharmacorésistants », seul un petit nombre de candidats est retenu pour la chirurgie de résection.

La localisation du foyer épileptogène est loin d'être aisée. On a recours à de nombreuses méthodes, allant de la localisation de sources en EEG jusqu'à l'imagerie IRM spectroscopique. Chacune a ses avantages et inconvénients et les neurochirurgiens n'hésitent pas à coupler plusieurs de ces méthodes.

Il existe une méthode permettant d'allier la résolution spatiale de l'IRMf à la résolution temporelle de l'EEG : c'est l'IRMf/EEG (Grouiller (2008)).

2.1.7 Intérêt et principe de l'IRMf/EEG

2.1.7.1 Intérêt

Comme nous venons de le voir en 2.1.5, l'EEG est une technique non invasive d'excellente résolution temporelle qui joue un rôle crucial dans le diagnostic et la classification des épilepsies. Toutefois, la résolution spatiale de l'EEG est assez médiocre et malgré l'utilisation de la reconstruction de sources, la localisation du foyer épileptique n'est souvent qu'approximative.

1. La résection consiste à enlever la partie du cerveau considérée comme épileptogène. Cette intervention est couramment réalisée dans les cas d'épilepsies temporales, qui présentent le meilleur taux de succès.

La possibilité d'acquérir simultanément l'EEG et l'IRMf offre l'opportunité de bénéficier à la fois de l'excellente résolution temporelle de l'EEG et de la bonne résolution spatiale de l'IRM. Cette technique constitue donc un outil non invasif très prometteur pour localiser les régions dont les caractéristiques hémodynamiques varient avec l'activité paroxystique enregistrée à l'EEG. Elle donne aussi accès aux structures profondes, essentielles en épilepsie, qui sont hors de portée de l'EEG de scalp. La combinaison de l'IRMf et de l'EEG pourrait potentiellement permettre de se rapprocher des performances de la SEEG² en termes de résolutions temporelle et spatiale, tout en restant non invasif.

De plus, dans le cadre de mes travaux de recherche, l'étude de l'activité épileptique chez le rat GAERS (cf. 8.3) donne accès à des signaux neuronaux particulièrement forts. L'étude du chapitre 8 permet donc de valider la technique d'IRMf chez le petit animal. En effet, les crises d'épilepsie observées chez le GAERS induisent des variations de signal BOLD importantes, que l'on peut corrélérer avec les événements représentés par les pointes épileptiques.

2.1.7.2 Principe

L'IRMf permet de localiser les régions cérébrales dans lesquelles des variations de l'activité hémodynamique sont induites par des événements d'origine neuronale pendant une condition expérimentale, par rapport à une condition de contrôle. C'est une méthode fréquemment utilisée pour réaliser des études cognitives permettant un contrôle par l'expérimentateur des conditions expérimentales et de repos. (cf. 1.3)

Pour les acquisitions IRMf couplées à l'EEG réalisées chez les patients épileptiques, la condition expérimentale est déterminée par la survenue d'une décharge épileptique sur l'EEG alors que la condition de contrôle correspond à une période durant laquelle l'EEG est normal. Étant donné que l'enregistrement d'une crise dans l'IRM est difficilement réalisable, ce sont généralement les activités intercritiques³ qui servent de marqueurs des événements d'intérêts en IRMf/EEG.

Les événements épileptiques extraits de l'EEG, soit de type binaire (épilepsie ON/OFF), soit de type continu (émission de puissance de pointe-ondes), sont ensuite convolués par la fonction de réponse hémodynamique (FRH) afin de modéliser la variation de signal BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent) attendue dans les régions cérébrales générant cette activité électrique. Par analyse statistique, il est possible de déterminer des régions dans lesquelles les variations du signal BOLD sont significativement corrélées au signal prédit à partir de l'EEG. Dans ces régions, le signal BOLD recueilli suite à la survenue d'événements épileptiques peut augmenter ou diminuer par rapport à la ligne de base. On parle alors respectivement d'activations ou de désactivations (Fig. 2.2).

Les variations de signal BOLD en réponse à une décharge intercritique permettent ainsi de localiser la zone irritative générant ces décharges. Cette région ne coïncide pas forcément avec la zone épileptogène que l'on cherche à identifier dans le cadre des évaluations préchirurgicales. Toutefois, les relations entre ces deux zones sont telles que des informations utiles

2. cf. 2.1.5

3. Entre deux crises d'épilepsie, la plupart des patients présentent, de façon totalement asymptomatiques, de brèves décharges générant une pointe EEG.

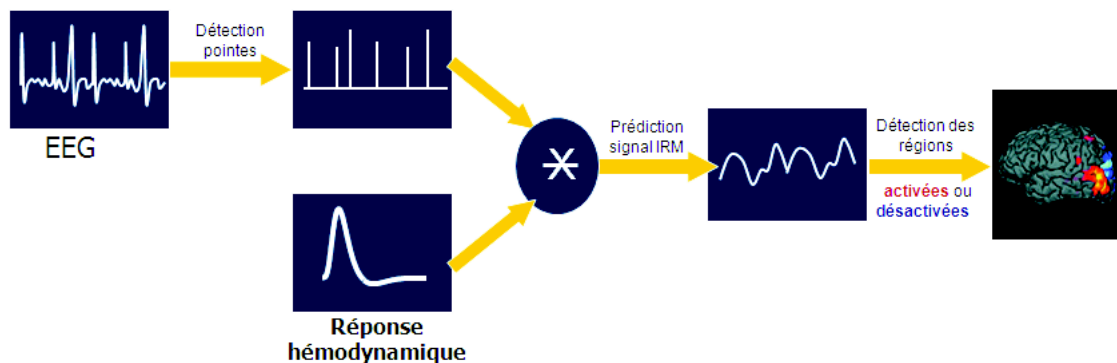


FIGURE 2.2 – Principe de la cartographie des réseaux épileptiques par IRMf/EEG. D’après Grouiller (2008).

peuvent souvent être obtenues sur la topographie des réseaux épileptiques grâce à l’étude des pointes intercritiques.

À l’heure actuelle, cette méthode n’a pas encore fait l’objet de validations suffisantes pour être utilisée seule lors de l’exploration préchirurgicale. Il subsiste donc encore le besoin de valider ces techniques chez l’Homme, mais aussi chez le petit animal, ainsi que d’étudier le potentiel de méthodes statistiques innovantes pour la cartographie des réseaux épileptiques (cf. 4.3.3).

2.2 Maladies chroniques de l’intestin (MICI)

La maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique constituent les maladies inflammatoires chroniques de l’intestin (MICI), impliquant l’intestin grêle, le côlon et le rectum. Les MICI se caractérisent par une réponse disproportionnée du système immunitaire face à des éléments naturels. En effet, le tube digestif étant l’interface entre les agents extérieurs et le milieu intérieur, le système immunitaire y est très présent puisqu’il se doit de s’activer et de prévenir une infection potentielle.

Pour cela, les cellules sentinelles du système immunitaire vont reconnaître les éventuels agresseurs et adapter la réponse immunitaire. En temps normal, la réponse inflammatoire est modérée lorsqu’il s’agit d’un agent bénéfique et il y a apparition d’une tolérance entre l’organisme et l’agent extérieur.

Lorsque des agents pathogènes, viraux ou bactériens, sont détectés, ceux-ci vont non seulement être éliminés, mais il va aussi se produire une mémorisation de l’agresseur par le système immunitaire ce qui permettra, lors d’une seconde rencontre, une réaction immunitaire plus adaptée et plus rapide.

Dans le cas des MICI, le système immunitaire va être activé, entre autres, par les bactéries habituelles se trouvant dans la flore intestinale et non pathogènes en temps normal. Il s’agit d’

une dérégulation de la réponse immunitaire dirigée contre les cellules des parois intestinales. Cette hyper réactivité est responsable des phénomènes inflammatoires.

Ces deux pathologies restent aujourd'hui encore méconnues et peu évoquées en raison de leurs symptômes (diarrhées notamment) mais aussi très invalidantes (douleurs abdominales, perte de poids, fièvre...), notamment dans le cas des formes les plus graves (35% des cas). Toutes deux évoluent par période de poussées inflammatoires entrecoupées de périodes de rémissions plus ou moins longues selon les patients.

Chapitre 3

Techniques de stimulation cérébrale

Dans ce chapitre sont présentées différentes techniques de stimulation électrique du système nerveux, potentiellement utilisées dans le traitement des pathologies présentées au chapitre précédent :

- la stimulation du nerf vague, utilisée chez l’homme dans le traitement de certaines épilepsies pharmacorésistantes, et explorée dans le cadre d’un modèle de colite chez le rat ;
- la stimulation cérébrale profonde, qui est l’objet principal de mes travaux de recherche, utilisée à l’heure actuelle dans le traitement de la maladie de Parkinson, mais aussi dans de nombreuses autres pathologies.

3.1 Stimulation du système nerveux périphérique : la stimulation du nerf vague

3.1.1 Intérêt thérapeutique

Diverses pathologies sont aujourd’hui traitées par la stimulation du nerf vague (SNV) : dépression, anxiété, maladie d’Alzheimer, migraines, etc. (Groves and Brown (2005))

À l’heure actuelle, la SNV est le seul traitement par stimulation reconnu aux Etats-Unis dans le cadre de l’épilepsie ¹ (Ben-Menachem (2002)) et constitue par ailleurs une piste intéressante de traitement des maladies chroniques de l’intestin. Nous nous intéresserons dans cette partie uniquement à ces deux pathologies.

3.1.1.1 Dans le cadre de l’épilepsie

Les essais cliniques ont démontré l’efficacité modérée de la technique dans le traitement de certaines épilepsies. Son intérêt majeur, face à la stimulation cérébrale profonde, est la moindre invasivité de l’intervention. En effet, l’électrode est implantée dans le cou et non dans le cerveau. (cf. figure 3.1)

Aujourd’hui, plus de 40 000 patients ont été traités à l’aide de la SNV. Chez la plupart des patients, le nombre de crises est réduit et il est possible de diminuer les doses médicamenteuses. La SNV présente quelques effets secondaires, dont la plupart sont bénéfiques : réduction des

1. Certains traitements par stimulation intracérébrale sont à présent reconnus en Europe.

somnolences diurnes (Malow et al. (2001)), amélioration de l'humeur (Harden et al. (2000)) et de la mémoire (Clark et al. (1999)), et permet une amélioration globale de la qualité de vie des patients (Dodrill and Morris (2001)). Les complications graves restent rares ; les effets indésirables (toux, paresthésies locales, ...) ne perdurent pas une fois la stimulation arrêtée, et disparaissent le plus souvent après quelques années (Boon et al. (1999)).

La technique de stimulation du nerf vague présente donc de bons résultats en terme d'efficacité et est assez largement utilisée. Pourtant, malgré 40 000 patients implantés, il reste difficile d'établir des facteurs prédictifs de l'efficacité de la SNV, et ses mécanismes restent à élucider.

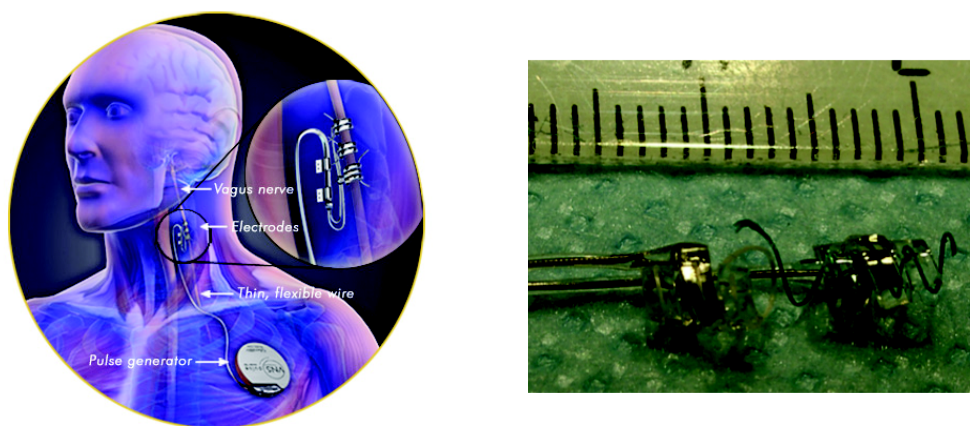


FIGURE 3.1 – À gauche : Schéma d'une implantation d'électrode de stimulation du nerf vague. Image Cyberonics ©

À droite : Électrode utilisée pour la stimulation du nerf vague chez l'homme. Ce sont ces électrodes qui ont été utilisées dans les manipulations de stimulation du nerf vague chez le rat (cf. chapitre 9).

3.1.1.2 Dans le cadre des maladies chroniques de l'intestin

C'est seulement en 2000 que le rôle anti-inflammatoire de la stimulation du nerf vague a été découvert (Borovikova et al. (2000)), et la stimulation du nerf vague dans le traitement des maladies chroniques de l'intestin (MICI) n'est pas, à l'heure actuelle, un traitement reconnu chez l'homme.

Des pistes intéressantes sont explorées par l'équipe 8 du GIN (Étude du stress et des interactions neuro-digestives), qui étudie le rôle anti-inflammatoire de la SNV dans un modèle de colite chez le rat (Meregnani (2009); Meregnani et al. (2011); Picq (2012)).

Typiquement, ces études montrent que la SNV, à des fréquences plus basses que celles utilisées en épilepsie, a un effet anti-inflammatoire au niveau des intestins, et provoquerait donc une activation des efférences vagales.

C'est dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe 8 que nous nous sommes intéressés à l'étude des effets centraux de cette SNV. En effet, on ne peut écarter l'hypothèse que, même aux

fréquences utilisées par Meregnani (2009), la SNV ait un effet sur le système nerveux central, qu'il joue un rôle dans le processus anti-inflammatoire ou non.

Ces travaux expérimentaux ont préparé la mise en place d'un protocole de recherche clinique unique au monde débuté en 2012 au CHU de Grenoble, au sein duquel deux patients sont actuellement implantés.

3.1.2 Mécanismes de la stimulation du nerf vague

Dans cette section nous étudierons principalement les mécanismes ascendants de la stimulation du nerf vague, dans la mesure où les effets anti-inflammatoires sur l'appareil digestif sortent du cadre de notre étude.

Le nerf vague est un nerf mixte composé d'environ 20 % de fibres efférentes et 80 % de fibres afférentes. Il est appelé aussi nerf pneumogastrique, nerf cardio-pneumo-entérique, nerf parasympathique ou encore nerf X puisqu'il constitue la 10^{ème} paire des nerfs crâniens. C'est aussi le plus long des nerfs crâniens.

Le nerf vague est directement relié à plusieurs noyaux centraux situés dans le tronc cérébral :

- le noyau ambigu, noyau somato-moteur, partagé avec le nerf glossopharyngien, centre moteur du nerf vague contenant les noyaux des fibres broncho-motrices viscérales,
- le complexe vagal dorsal, composé du noyau moteur dorsal du vague, du noyau du tractus solitaire (NTS) et de l'area postrema.

Le nerf vague possède plusieurs fonctions : il est moteur, sensitif, végétatif et anti-inflammatoire. Il a tout d'abord un rôle moteur véhiculé par ses efférences. Ce rôle moteur s'exerce sur un grand nombre d'organes : cœur, poumons, voile du palais, pharynx, larynx, trachée, bronches, estomac, intestin grêle et côlon. Il va notamment contrôler les sécrétions gastriques et biliaires.

Au niveau du cœur, le nerf vague va être inhibiteur et son activité va se traduire par une diminution de la fréquence cardiaque. Au contraire, au niveau du tube digestif, le nerf vague va plutôt avoir un effet stimulant puisqu'il va augmenter le péristaltisme et la sécrétion gastrique. Il faut aussi souligner que, par l'intermédiaire de ses fibres broncho-motrices qui vont donner le nerf récurrent, le nerf vague est le nerf de la phonation.

Les effets de la SNV sur l'épilepsie passent par l'induction de potentiels d'action le long du nerf vague gauche². Ce sont donc certainement les connections neuroanatomiques qui sous-tendent les effets thérapeutiques de la SNV. (Groves and Brown (2005))

Aux fréquences utilisées pour le traitement de l'épilepsie, les efférences viscérales semblent très peu activées, tandis que les muscles de la vocalisation sont quelquefois activés de façon réversible par la SNV.

2. C'est toujours le nerf gauche que l'on stimule, car la stimulation du nerf vague droit entraîne d'importantes modifications du rythme cardiaque.

Tout porte donc à croire que c'est au niveau du système nerveux central qu'opère la SNV. Chez l'homme comme chez l'animal, il a été montré que la SNV occasionne une désynchronisation de l'activité neuronale, ce qui pourrait conduire à une diminution de l'hypersynchronisme neuronal, et donc réduire le nombre de crises.

Pourtant, l'effet des paramètres de stimulation, nombreux (fréquence, intensité, durée d'une impulsion, durée du train d'impulsion, période de repos), semble trop compliqué pour être généralisé.

3.1.3 IRM fonctionnelle de la stimulation du nerf vague

Il est plus aisé d'aborder l'IRM fonctionnelle de la stimulation du nerf vague que de la stimulation cérébrale profonde. En effet, même si les électrodes se trouvent encore dans le champ magnétique créé par l'aimant, les artefacts de susceptibilité causés par les électrodes ne posent plus problème. Les craintes concernant la sécurité des patients ont été écartées par Bohning et al. (2001).

Différentes études ont été menées en imagerie de la SNV. Pour une revue de ces études, voir Chae et al. (2003). La plupart ont pour sujet des patients, épileptiques ou dépressifs, pour lesquels la SNV a fait l'objet d'ajustements des paramètres, supposés ne pas induire de modifications du rythme cardiaque, ni d'autres facteurs hémodynamiques confondants.

L'IRMf de la SNV est plus délicate chez le petit animal, car elle provoque le plus souvent des modifications des constantes physiologiques. Il est alors nécessaire de trouver des moyens permettant, par IRMf, de distinguer les effets neuronaux de la stimulation, et ceux provenant des modifications de rythme cardiaque, fortement corrélés à la stimulation. Nous reviendrons en détail sur ces questions dans le chapitre 9, et nous verrons comment ce problème peut être réglé (Reyt et al. (2010)).

3.2 Stimulation du système nerveux central : la stimulation cérébrale profonde

La première stimulation cérébrale profonde (SCP) chronique à haute fréquence (130 Hz) a été réalisée en 1987 chez des patients parkinsoniens présentant des tremblements sévères (Benabid et al. (1987)). En une vingtaine d'années, la technique a prouvé être une alternative satisfaisante aux traitements médicamenteux existants (Benabid et al. (2001)).

En effet, la SCP présente très peu d'effets secondaires, contrairement aux traitements dopaminergiques qui induisent au bout de quelques années des akynésies et diskynésies, pour finalement perdre tout effet bénéfique. Nous avons maintenant le recul nécessaire pour affirmer que la SCP n'induit aucun effet délétère sur le tissu, et que ses effets persistent sur le long terme, tout en étant totalement réversibles par arrêt de la stimulation.

Pourtant, les mécanismes d'action de la SCP restent, encore aujourd'hui, très peu compris (Benabid et al. (2002)). Il est donc fondamental, devant l'essor récent de cette technique, de mener des études expérimentales nous permettant de comprendre ses mécanismes d'action.

Devant les difficultés de sécurité rencontrées pour l'étude de la SCP chez l'homme par IRMf, il est évident que ces études couplant SCP et IRMf passeront par les modèles animaux.

Ces dernières années, le champ d'application de la SCP s'est élargi à de nombreuses pathologies. On entrevoit des possibilités thérapeutiques importantes, notamment dans le traitement de la dépression (Lozano et al. (2008) ; Lozano et al. (2012)), des troubles obsessionnels compulsifs (Mallet et al. (2008) ; Bourne et al. (2012)) ou de l'obésité (Halpern et al. (2008)). (Chang (2004))

Nous nous intéresserons ici à l'application de la technique de la SCP à l'épilepsie. En effet, parmi les patients pharmacorésistants candidats à la chirurgie de résection, des patients possèdent une zone épileptogène proche des aires fonctionnelles essentielles (langage, vision, motricité, etc.), ou bien présentent des crises multifocales, bilatérales ou généralisées. Pour ces patients, la SCP constitue une solution prometteuse faisant l'objet de nombreuses recherches. (Lockman and Fisher (2009); Wyckhuys et al. (2009); Kahane and Depaulis (2010); Ooi et al. (2011); Rolston et al. (2011))

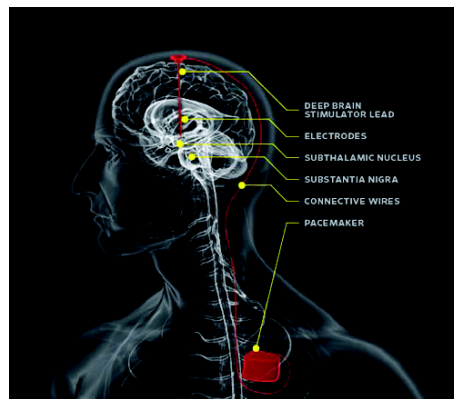


FIGURE 3.2 – Schéma de principe de la stimulation cérébrale profonde. D'après *Wired*®

3.2.1 Intérêt thérapeutique

Le but de la SCP dans le cas de l'épilepsie est de réduire la fréquence ou la propagation des crises. Elle interviendrait lorsque les opérations de résection sont compromises, et pourraient à terme devenir un traitement utilisé en routine, au vu de l'innocuité de la stimulation.

Bien que le cortex joue un rôle majeur dans la genèse des crises épileptiques, de nombreuses études montrent un rôle crucial de certaines structures sous-corticales dans la propagation et le contrôle des crises épileptiques chez l'homme. (Semah (2002) ; Vercueil and Hirsch (2002))

De nombreuses cibles potentielles pour la stimulation haute fréquence ont été étudiées, dont le cervelet, quelques noyaux du thalamus, et une partie des noyaux des ganglions de la base. Bien qu'encourageantes, ces études n'ont pas réussi à atteindre de conclusion définitive, car il reste des zones d'ombre sur les mécanismes d'action de la SCP en épilepsie.

Il est donc nécessaire de poursuivre les études expérimentales, notamment grâce à des modèles animaux de l'épilepsie. (Lado (2006); Wyckhuys et al. (2007); Zhong et al. (2011); Stypulowski et al. (2011))

3.2.2 Mécanismes de la stimulation cérébrale profonde

A l'heure actuelle, les mécanismes de la stimulation haute fréquence (SHF) permettant la récupération fonctionnelle dans le cadre de la maladie de Parkinson sont encore peu connus et font l'objet de nombreux débats dans la littérature internationale (Benabid et al. (2002); Dostrovsky and Lozano (2002); McIntyre et al. (2004a)).

La similitude des effets produits par la lésion et la stimulation du noyau subthalamique (NST) a initialement mené à penser que la SHF induisait une inhibition des neurones du NST via un phénomène de blocage de dépolarisation (Benazzouz et al. (1995); Beurrier et al. (2001); Magarnos-Ascone et al. (2002)). Cette hypothèse a été renforcée par des études métaboliques et électrophysiologiques qui ont montré une diminution de l'expression de l'ARN messenger dans le NST (Salin et al. (2002); Tai et al. (2003)) et une baisse de l'activité de la substance noire réticulée (SNr) et du noyau entopédoculaire chez le rat après stimulation subthalamique (Benazzouz et al. (1995)).

Cependant, compte tenu des artefacts liés à la stimulation, ces données ont été obtenues immédiatement après l'arrêt de celle-ci et ne rendent donc compte que des effets postérieurs liés à cette stimulation électrique. Ainsi, des questions subsistent quant aux mécanismes induits par la SHF du NST pendant son application et non pas après son interruption. Par ailleurs, des études électrophysiologiques menées sur des tranches de cerveau de rat ont montré que les neurones du NST pouvaient être activés par dépolarisation à des fréquences bien supérieures à celles utilisées en clinique humaine (Bevan and Wilson (1999)).

Ces arguments, qui ont conduit à remettre en question la théorie du « blocage de dépolarisation », ont rapidement été renforcés par d'autres données. Tout d'abord, une étude réalisée sur des tranches de cerveau de rat a montré que la SHF (100-140 Hz) du NST induisait une excitation des neurones du NST (Lee et al. (2003)). Ensuite, des données électrophysiologiques obtenues chez le singe ont montré que la SHF du NST induisait une augmentation de l'activité des neurones du globus pallidus interne, structure de projection du NST (Hashimoto et al. (2003)). Enfin, des études de microdialyse réalisée chez le rat sain ont permis d'observer une augmentation des taux de glutamate (Glu) et de GABA au niveau de la SNr au cours de la SHF du NST (Windels et al. (2000)), suggérant ainsi l'implication de mécanismes à la fois inhibiteurs et excitateurs.

Au final, la question de l'effet inhibiteur ou excitateur de la SHF du NST ne semble pas posséder de réponse simple. Au niveau du NST, il semblerait que la SHF supprimerait l'activité spontanée et pathologique de celui-ci pour la remplacer par un patron d'activité plus régulier calqué sur la stimulation elle-même (Garcia et al. (2003); Garcia et al. (2005)). D'autre part, la SHF n'affecte pas de la même façon le soma et les axones, de même que les fibres passant au travers ou à proximité de la structure stimulée (McIntyre et al. (2004a); McIntyre et al. (2004b)).

De plus, des études comportementales, électrophysiologiques et neurochimiques montrent que les effets de la SHF sont largement dépendants des paramètres de stimulation utilisés. À basse fréquence (10-50Hz), la stimulation du NST n'améliore pas, voire aggrave les symptômes moteurs parkinsoniens (Rizzone et al. (2001) ; Moro et al. (2002)) et ne permet pas de normaliser l'activité pathologique du NST, quelque soit la valeur des autres paramètres de stimulation (Garcia et al. (2005)). Cette absence d'effet s'accompagne d'une absence de modifications des taux de Glu et de GABA dans la substance noire réticulée et le globus pallidus chez le rat (Winkels et al. (2003)).

Enfin, Maurice et collaborateurs ont montré qu'au cours de la SHF du NST, l'activité des neurones de la SNr de rats anesthésiés dépendait de l'intensité de stimulation. Pour de fortes intensités ($> 80 \mu\text{A}$) les neurones étaient activés alors qu'ils étaient inhibés pour de faibles intensités ($20 - 80 \mu\text{A}$) (Maurice et al. (2003)). Ainsi, pour des paramètres classiquement utilisés en clinique humaine (130 – 185 Hz, 60 – 100 μs , 1 – 3 mA), il est aujourd'hui admis que la résultante des mécanismes de la SHF du NST correspond à une inhibition des voies de sortie des ganglions de la base (GPi/EP et SNr) dans laquelle l'activation de la transmission GABAergique semble jouer un rôle primordial. Cependant, ces études sur animaux semblent difficilement transposables à l'homme, et certaines études montrent des diminutions du GABA dans le cortex moteur humain lors de la stimulation du NST (Stefani et al. (2011b,a)).

Voilà maintenant plus de vingt ans que l'on cherche à expliquer le succès de la SHF dans le traitement de la maladie de Parkinson, et le consensus commence à peine à se dessiner.

Mais qu'en est-il pour les autres maladies que l'on cherche à guérir par la stimulation cérébrale? Ce que ces vingt années de recherche nous ont appris, c'est que les mécanismes de la stimulation sont loin d'être simples. Il faut donc continuer ces études, et chercher comment se comporte la stimulation sur d'autres cibles. (Benabid (2007))

3.2.3 Étude de la stimulation cérébrale profonde par IRM fonctionnelle

Comme nous venons de le voir, le but de la SCP est de moduler les réseaux fonctionnels dégradés par les différentes pathologies que nous avons abordées, notamment dans le cas de pathologies pharmacorésistantes.

Afin de mieux comprendre les mécanismes complexes de la SCP et la modulation de ces réseaux, il peut être intéressant de développer la technique de l'IRM fonctionnelle de la SCP chez l'animal. En effet, l'IRMf permet d'observer les changements hémodynamiques induits par la SCP sur le cerveau entier, avec une bonne résolution spatiale, contrairement aux études EEG ou intracellulaires, qui se chargent de répondre aux questions soulevées au niveau neuronal.

Peu d'études de ce type ont été menées pour l'instant chez l'homme, pour des raisons de sécurité du patient. On ne connaît pas suffisamment bien le comportement des électrodes en fonctionnement dans un champ magnétique, ni leur réponse aux champs radiofréquences et aux commutations rapides de gradient (Carmichael et al. (2007)). C'est pourquoi toutes les études portant sur l'IRMf de la SCP ont été effectuées en post-opératoire avec des stimulateurs extériorisés (Hesselmann et al. (2004); Arantes et al. (2006)).

Pour une revue des travaux effectués en IRMf de la SCP, notamment sur la sécurité des patients, voir Zrinzo et al. (2011). Je citerai ici deux études.

- Une étude pilote, effectuée sur 4 patients, a montré la faisabilité de l’IRMf de la SCP (Jech et al. (2001)³).
- Une autre étude de cas intéressante, Stefurak et al. (2003), porte sur une patiente parkinsonienne, récemment implantée, de façon bilatérale, d’électrodes de stimulation profonde dans le noyau subthalamique. Peu de temps après la stimulation, la patiente a vécu un changement brutal d’état mental, en présentant notamment des signes de dépression. Elle a donc subi un examen IRMf avec électrodes activées, qui a démontré que l’électrode droite avait été mal placée. Lorsque le côté gauche était stimulé, on observait une réponse BOLD⁴ dans les aires motrices, mais lorsque l’électrode droite était mise en marche, en plus de quelques activations dans ces mêmes zones motrices, des augmentations de signal BOLD ont été observées dans de nombreuses autres aires cérébrales, dont le cortex préfrontal, le cortex cingulaire antérieur et le tronc cérébral.

Ces études ont montré la faisabilité de l’IRMf de la SCP malgré les problèmes de sécurité et d’imagerie qu’elle peut poser. Pourtant, l’innocuité totale de la technique reste à prouver, et les études portent, pour l’instant, principalement sur ces problèmes. (Gupte et al. (2011))

Le frein majeur que constituent les problèmes de sécurité aux études chez l’homme a naturellement entraîné la poursuite des études chez le petit animal (Canals et al. (2008)) et chez le singe (Logothetis et al. (2010)).

Comme signalé en 1.3.4, l’application de l’IRMf au petit animal possède en soi quelques problèmes de taille. Pour l’étude de la SCP, des contraintes supplémentaires viennent s’ajouter, notamment la présence d’électrodes de stimulation. Nous reviendrons en détail sur la problématique du choix de l’électrode de stimulation dans le chapitre 6. L’importance du choix de l’anesthésie sera étudiée plus en détail dans le chapitre 5, et le chapitre 7 traitera des développements méthodologiques effectués pour l’établissement d’un protocole d’IRMf de la SCP.

3.3 Objectifs et plan

L’objectif principal de cette thèse est l’étude des mécanismes à distance de la stimulation électrique intracérébrale et de la stimulation du nerf vague par IRMf chez le rat.

Pour ce faire, la suite de ce manuscrit sera découpé en deux parties distinctes.

Dans une première partie, je présenterai les développements méthodologiques nécessaires à ces études. Nous commencerons par la méthodologie IRM, et verrons quelles sont les séquences à utiliser en IRMf, ainsi que les méthodes d’analyse des données actuelles. Nous aborderons ensuite la recherche d’un anesthésique permettant l’établissement d’activations neuronales suffisant à entraîner des modifications hémodynamiques détectables en IRM. Enfin, le

3. Voir aussi une réponse à cet article pour quelques éclaircissements : Journée (2003)

4. Blood oxygen level dependant, cf. 1.9

choix et la fabrication d'électrodes utilisables en IRM pour l'étude de la stimulation électrique intracérébrale fera l'objet d'un troisième chapitre.⁵

La deuxième partie exposera les résultats obtenus durant cette thèse. En premier lieu, je montrerai comment les aspects méthodologiques décrits précédemment ont été validés par des manipulations d'hypercapnie et de stimulation du système nerveux périphérique en IRMf du petit animal. Ensuite, je présenterai la validation de l'IRMf/EEG chez le rat GAERS grâce aux techniques statistiques de modélisation causale dynamique (DCM), ayant permis la validation de modèles de connectivité neuronales, auparavant difficilement accessibles en IRMf (David et al. (2008)). Puis, nous verrons comment la DCM permet, malgré la présence d'un bruit physiologique important venant polluer le signal IRMf, de prouver la présence d'activations neuronales lors de la stimulation du nerf vague à des fréquences censées activer les efférences vagales (Reyt et al. (2010)). Je présenterai enfin quelques résultats préliminaires obtenus lors de stimulations électriques intracérébrales.

Enfin, je conclurai ce manuscrit par une discussion sur les résultats obtenus, les perspectives à explorer lors d'études futures, et je résumerai les points méthodologiques importants à régler afin d'obtenir des résultats satisfaisants en IRMf du petit animal.

5. Des études approfondies autour de ce sujet ont fait l'objet d'un stage en collaboration entre le GIN et le CEA-LETI.

Deuxième partie

Développements méthodologiques

Chapitre 4

Développements méthodologiques en IRM

4.1 La plate-forme IRM de Grenoble

Le début de la thèse s'est déroulé au sein de l'unité 594 de l'INSERM. La plate forme IRM petit animal était alors composée de :

- un aimant horizontal Bruker à 2,35 T installé en 1990. Le diamètre interne de l'aimant est de 400 mm. Le diamètre interne du fourreau de gradient de 200 mm et la capacité du système de gradient de 96 mT/m. Le spectromètre est équipé d'un système d'exploitation SMIS/MRRS ;
- un aimant horizontal Magnex à 7,0 T installé en 1998. Le diamètre interne de l'aimant est de 400 mm. Le diamètre interne du fourreau de gradient de 200 mm et la capacité du système de gradient de 200 mT/m. Le spectromètre est équipé d'un système d'exploitation SMIS/MRRS ;
- un aimant vertical Bruker à 4,7 T installé en 1984. Le diamètre interne de l'aimant est de 98 mm. Le diamètre interne du fourreau de gradient de 62 mm et la capacité du système de gradient de 110 mT/m. Le spectromètre est équipé d'un système d'exploitation SMIS/MRRS. Cet aimant n'est plus utilisé.

À la fin de la première année de thèse (2008), l'équipe a déménagé au sein du GIN. La plate-forme s'est alors équipée de deux nouveaux instruments :

- Un aimant horizontal 4,7 T Bruker Biospec 47/40 USR AV III system. Le diamètre interne de l'aimant est de 400 mm. Le diamètre interne du fourreau de gradient de 120 mm et la capacité du système de gradient de 600 mT/m. Le spectromètre est équipé d'un système d'exploitation Bruker Avance III.
- Un aimant horizontal 7,0 T Bruker Biospec 70/20 USR AV III system. Le diamètre interne de l'aimant est de 200 mm. Le diamètre interne du fourreau de gradient de 120 mm et la capacité du système de gradient de 600 mT/m. Le spectromètre est équipé d'un système d'exploitation Bruker Avance III.

Au cours de ce déménagement, l'ancien système à 7,0 T n'a pas été remis en champ. Après remise en champ de l'aimant à 2,35 T, il s'est avéré que le champ statique n'était plus stable. Après quelques mois, alors qu'il n'était plus possible de l'utiliser, celui-ci a été mis hors service.

4.2 La séquence d'Echo-Planar Imaging

4.2.1 La séquence de gradients

Le principe de l'Echo-Planar Imaging (EPI) est d'effectuer une image complète d'une tranche en un petit nombre d'excitations (cf. 1.2.3.3), ce qui permet d'acquérir un volume en quelques secondes. Selon le nombre de ces excitations, on parle d'EPI single-shot (ou one-shot) ou d'EPI multishot. Dans un premier temps nous allons introduire l'EPI single-shot.

On parcourt l'espace-k en le balayant dans la direction de lecture grâce à de puissants gradients (figure 1.8). La sollicitation importante du gradient, ainsi que la nécessité d'acquérir plusieurs centaines d'images consécutives, imposent de laisser des temps de refroidissement pour prévenir le risque de surchauffe. D'autre part, la direction de phase est parcourue ligne par ligne grâce à de petits « blips », occasionnant un saut de ligne dans l'espace réciproque.

Le TE (temps d'écho), est défini comme le temps auquel on acquiert le centre de l'espace réciproque, ou le centre de la ligne de cet espace dans le cas d'un encodage de phase. Ici ceci correspond à la moitié de la séquence de gradients. C'est à ce moment que le signal reçu est le plus fort, et si on fait correspondre le TE au T_2^* (en attendant plus ou moins entre l'excitation et le début de l'acquisition), on fera une image en contraste T_2^* de l'échantillon¹, le contraste étant défini par le centre de l'espace réciproque (fréquences spatiales faibles).

Dans une séquence classique avec des pas d'encodage de phase, chaque ligne de l'espace-k est acquise de façon identique, ce qui facilite grandement la reconstruction. En EPI, chaque ligne acquise a des caractéristiques différentes, de par l'histoire différente des spins depuis l'excitation. Typiquement des problèmes de discontinuité de phase le long de la direction de phase vont apparaître, occasionnant d'importants artefacts dans l'image. Une grosse part de l'obtention d'une image correcte passe par la reconstruction de l'image en vue de supprimer ces artefacts.

4.2.2 Reconstruction des images

Si les gradients étaient commutés de façon instantanée, on se déplacerait de façon cartésienne dans l'espace réciproque. Malheureusement chaque commutation est forcément composée d'une rampe d'établissement du gradient, occasionnant alors des trajectoires courbes dans l'espace réciproque. Le plus souvent ces rampes sont linéaires, et d'après la figure 1.8, le gradient de lecture est une succession de rampes suivies de tenues de gradients, et les blips sont constitués de deux rampes (on souhaite la durée des blips la plus courte possible). La figure 4.1 montre un exemple de trajectoire parcourue dans l'espace-k lors d'une séquence EPI.

Pour effectuer une transformée de Fourier à deux dimensions de l'espace réciproque, il faut que l'on ait des valeurs aux points d'une grille cartésienne (en bleu sur la figure 4.1). Or, les points acquis n'étant pas toujours sur cette grille, on va devoir passer par une étape de « regridding », c'est-à-dire interpoler les valeurs aux points souhaités à partir des valeurs acquises.

1. En effet, en IRMf, pour obtenir les plus grandes variations de signal BOLD, on souhaite un contraste en T_2^* .

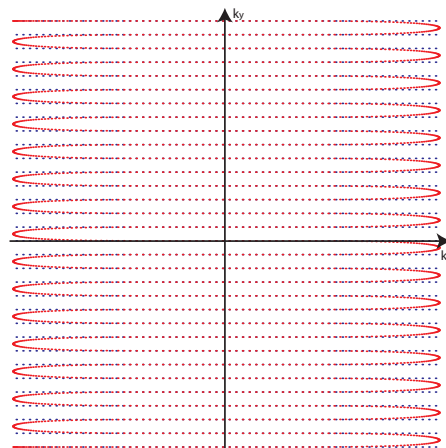


FIGURE 4.1 – En rouge : points échantillonnés lors de l’acquisition.
En noir : grille cartésienne que l’on doit remplir pour pouvoir en faire la transformée de Fourier

On remarque que lors des tenues de gradients de lecture, la grille cartésienne coïncide avec l’acquisition. Ici il n’y aura pas besoin de regridding. Or ces points sont les plus importants pour obtenir l’image, car ils correspondent aux fréquences spatiales faibles. On pourrait presque s’affranchir des fréquences élevées, dans la mesure où elles contiennent le plus souvent du bruit, mais malheureusement sur des systèmes de gradients ayant des temps de montée de gradients trop importants, le nombre de points acquis pendant le plat du gradient de lecture est très faible. Ceci nous oblige à tenir compte des points acquis pendant les rampes.

Ici on utilise une interpolation linéaire. On stocke dans une matrice les coordonnées des points acquis et celles des points recherchés. Pour chaque point de la grille cartésienne on recherche ses proches voisins, puis on effectue la moyenne des valeurs en ces points, pondérées par leur distance au point voulu.

Il existe des techniques d’interpolation plus évoluées (Bruder et al. (1992) ; Dale et al. (2001) ; Moriguchi and Duerk (2004)). Nous n’en parlerons pas car l’interpolation des points des rampes n’est pas critique pour notre étude.

4.2.3 Les artefacts propres à l’EPI

L’EPI est plus sensible à l’apparition d’artefacts et de « ghost » (deuxième objet superposé à l’image et décalé) que la plupart des autres séquences pour trois raisons : la longue fenêtre d’acquisition, l’alternance droite/gauche des échos, et enfin la grande exigence au niveau de la fiabilité des gradients. Nous allons développer ces trois aspects séparément.

4.2.3.1 Conséquences d’une longue fenêtre d’acquisition

Même si les fréquences d’échantillonnage sont généralement plus élevées qu’en imagerie conventionnelle (pour augmenter la rapidité et pour pouvoir caler le TE sur le T_2^*), les temps de lecture sont plus longs en EPI (on acquiert plusieurs dizaines de lignes là où on en acquiert une en imagerie conventionnelle). Au cours de ce temps de lecture, l’échantillon est soumis

à deux gradients : le gradient de lecture et ce que nous avons appelé le gradient de phase. Ce dernier est en fait un gradient de lecture « déguisé », puisqu'il intervient *pendant* l'acquisition, et il a donc les propriétés d'un gradient de lecture. Comme l'acquisition d'une colonne requiert d'avoir parcouru tout l'espace réciproque, la bande passante dans la direction de phase va être beaucoup plus courte que dans la direction de lecture, d'un facteur à peu près égal au nombre de lignes acquises (Zou et al. (2005)).

Plusieurs effets découlent de cette faible bande passante et du long temps d'acquisition :

- Importance des décalages chimiques : jusqu'à présent nous avons implicitement supposé que tous les protons étaient équivalents. En fait, s'ils n'ont pas le même environnement ils précèdent à des vitesses légèrement différentes. Ceci va être interprété comme un décalage spatial par la transformée de Fourier. Typiquement, l'eau et la graisse vont apparaître décalées. Ce phénomène est amplifié par le long temps de lecture.
- Perte de résolution due au filtrage par le T_2^* : durant l'acquisition les spins se déphasent et le signal se perd peu à peu. Ceci équivaut un filtrage de la fenêtre d'acquisition par e^{-t/T_2^*} , entraînant alors un lissage de l'image, et donc une perte de résolution.

4.2.3.2 Sensibilité aux artefacts de susceptibilité magnétique

Un autre effet de la longue fenêtre d'acquisition est une importante perte de signal due aux artefacts de susceptibilité magnétique, majoritairement occasionnés par les interfaces tissu/air ou tissu/liquide. Ces artefacts sont présentés plus en détail en 6.2.1 dans le cas d'électrodes intracérébrales, mais lors d'une imagerie EPI chez le rat, il suffit de la proximité du sang liquide contenu dans les artères carotides pour occulter une partie du cerveau.

Sur la figure 4.2, on observe effectivement deux « trous » au niveau des artères carotides. Ceci empêche totalement l'observation de variations de flux sanguin, et donc d'activation neuronale dans ces régions occultées.

4.2.3.3 Alternance du sens des échos

Chaque écho pair est acquis avec un gradient négatif. Une première opération pour la reconstruction est donc d'inverser ces échos dans le temps. Toute imperfection dans le signal produit une alternance de cette imperfection une ligne sur deux. Ceci provoque l'apparition d'un ghost de Nyquist en $N/2$, c'est-à-dire qu'une image déplacée de la moitié du champ de vue apparaît.

4.2.3.4 Imperfections dues au système de gradients

Un dernier effet doit être considéré : une bobine de gradient réelle ne produit pas forcément le champ que l'on veut, notamment à cause des courants de Foucault. Et ceci se fait d'autant plus sentir que l'on demande des gradients importants commutés en des temps courts. Sur les spectromètres récents les constructeurs tiennent compte de ces courants de Foucault, les calculent et font en sorte d'envoyer des commandes modifiées ayant pour résultat les champs appliqués que l'on souhaite.

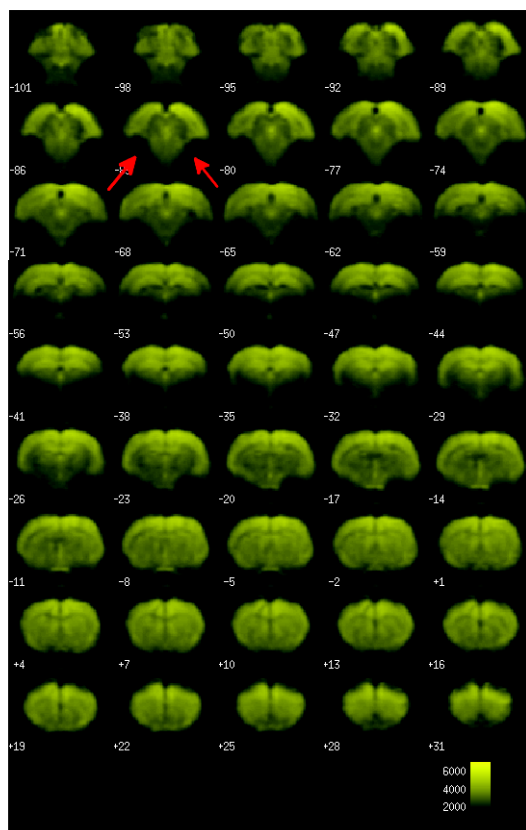


FIGURE 4.2 – En jaune : image EPI d'un cerveau de rat, superposées sur un template anatomique
Flèches : pertes de signal au niveau des artères carotides.

Une erreur sur les gradients appliqués équivaudrait à une erreur sur la trajectoire parcourue dans l'espace réciproque : notre interpolation s'avèrerait alors fautive. Faute de pouvoir appliquer exactement les gradients que l'on souhaite, nous pouvons toutefois établir une carte de champ pour mesurer les gradients effectivement appliqués, et ainsi avoir un espace-k de référence pour effectuer correctement l'interpolation (Duyn et al. (1998) ; Mason et al. (1997)).

4.2.4 La solution : les scans de référence

Pour pallier ces artefacts, on a généralement recours à un scan de référence. On effectue une séquence EPI normale pour tout le volume, mais on omet d'activer le gradient de phase. Ainsi, on balaye la ligne centrale de l'espace-k, et on acquiert alors la transformée de Fourier de la projection de l'objet selon y au cours du temps. Ceci correspond à un fort écho au centre de la ligne. On est alors en mesure de voir les échos se décaler passage après passage, et on peut quantifier les effets de l'alternance droite/gauche des échos et de la décroissance en T_2^* , ainsi que les variations de phase de chaque ligne de l'espace-k.

Il existe aussi des techniques de suppression du ghost qui ne requièrent pas de scan de référence (Lee et al. (2002) ; Lee et al. (2004) ; Buonocore and Zhu (2001) ; Hennel (1998)). Ces techniques sont basées sur les images obtenues après transformée de Fourier. Typiquement, s'il existe des zones où le ghost ne recouvre pas l'objet, on va pouvoir appliquer ces techniques. Nous ne nous étendrons toutefois pas sur ce sujet car le scan de référence offre de bons résultats, et on peut se permettre de faire un tel scan avant d'entamer une séquence d'imagerie fonctionnelle de plusieurs centaines de TR .

À présent nous allons voir comment corriger les imperfections du signal à partir du scan de référence.

La figure 4.3 montre un exemple de scan de référence. Une colonne représente un écho. De la gauche vers la droite on a placé côte à côte les échos acquis successivement. On observe alors la dérive de la position de ces échos, et l'alternance de cette position vers la droite ou vers la gauche.

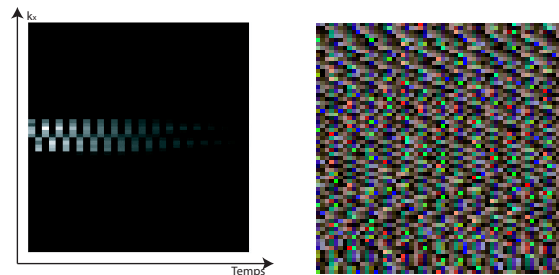


FIGURE 4.3 – Exemple d'un scan de référence, module (à gauche) et phase (à droite) du signal. On observe deux phénomènes sur le module : le décalage des lignes paires et impaires et la décroissance de l'intensité du signal en T_2^* . On observe aussi une différence de phase pour deux lignes acquises successivement. Ce scan de référence a été acquis en 48×48 à 7 T avec un TE de 13 ms et un TR de 2 s, avec une séquence EPI single-shot.

Comme on peut le voir sur la figure 4.3, les échos pairs et les échos impairs sont décalés les uns par rapport aux autres, et la phase présente d'importantes discontinuités le long de la direction de phase. (Feinberg and Oshio (1994))

Il est alors possible de corriger les données acquises avec gradient de phase en extrayant des informations du scan de référence. En effet, que ce soit avec ou sans gradient de phase, on suppose que le système d'acquisition se comporte de la même façon et introduit les mêmes retards et erreurs de phase.

Il convient tout d'abord de repérer l'écho dans la ligne. Pour cela on utilise un ajustement par une fonction gaussienne (figure 4.4).

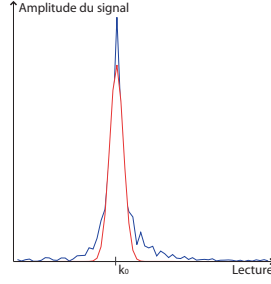


FIGURE 4.4 – On ajuste les échos de chaque ligne (en bleu) par une gaussienne (en rouge) pour trouver la position de l'écho sur la ligne (k_0).

La position de l'écho sur la ligne est notée k_0 . On en déduit ensuite la phase du pic principal de l'écho :

$$\Phi_0 = \arctan\left(\frac{\Im(S^R(k_0))}{\Re(S^R(k_0))}\right) \quad (4.1)$$

S^R représentant le signal non corrigé du scan de référence (S^P sera le signal avec encodage de phase et nous affublerons les signaux corrigés d'un '). On notera d'un indice n les signaux relatifs à la ligne n de l'espace réciproque.

Même si la correction à appliquer est très faible, elle a des conséquences non négligeables sur l'image finale, notamment en terme de rapport signal sur bruit. Voyons maintenant comment appliquer cette correction.

On sait que le signal que l'on souhaite obtenir doit avoir ces propriétés :

$$S_n^{P'}(k_L) = S_n^P(k_L - k_0(n)) \cdot e^{i\Phi_0(n)} \quad (4.2)$$

Et si l'on effectue la transformée de Fourier de ce signal :

$$S_n^{P'}(k_L) \xrightarrow{1D-FT} S_n^{P'}(x) = S_n^P(x) \cdot e^{i2\pi k_0(n)x} \cdot e^{i\Phi_0} \quad (4.3)$$

Il est alors facile de corriger les termes de phase en appliquant un filtre² (Schmidt et al. (1998)) :

$$F_n^L(x) = e^{-i2\pi k_0(n)x} \cdot e^{-i\Phi_0} \quad (4.4)$$

$$\Rightarrow S_n^P(x) = S_n^{P'}(x) \cdot F_n^L(x) \quad (4.5)$$

Et en effectuant une transformée de Fourier inverse à une dimension on retrouve l'espace réciproque corrigé (cf. fig. 4.5)

Il ne reste qu'à appliquer ces corrections au scan complet avec gradients de phase (cf. fig. 4.6)

2. k_0 et Φ_0 ont été déterminés grâce au scan de référence

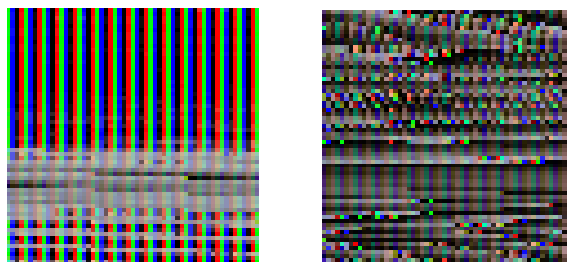


FIGURE 4.5 – Application de la correction sur le scan de référence (figure 4.3) ; module (à gauche) et phase (à droite) du plan de Fourier obtenu. On remarque que la plupart des problèmes ont disparu (il ne reste que la décroissance du signal)

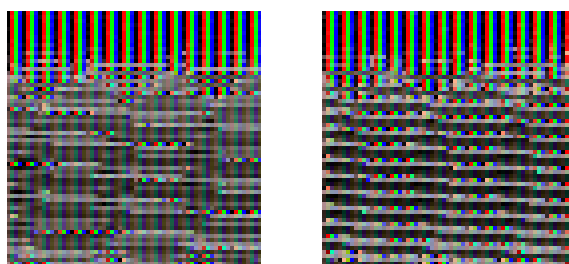


FIGURE 4.6 – Application de la correction à l'image. À gauche : image d'une seringue remplie d'eau obtenue sans correction de phase. À droite : image après correction : seul un faible ghost subsiste. Les paramètres d'acquisition sont les mêmes que pour le scan de référence.

4.2.5 L'EPI multishot

Nous allons à présent introduire la séquence EPI multishot, qui ressemble fortement à la séquence présentée auparavant, mais en acquérant l'espace réciproque en non plus une, mais plusieurs excitations. Nous allons voir pourquoi utiliser cette méthode et les problèmes que posent l'ajout d'excitations au niveau de la reconstruction et des artefacts.

Améliorations apportées À une résolution donnée, donc un nombre de blips donné, et selon les performances du spectromètre utilisé, correspond un temps d'écho minimum sous lequel on ne peut pas descendre avec une séquence EPI classique. Multiplier le nombre d'excitations pour une image nous permet alors d'avoir un TE plus faible, et éventuellement de pouvoir choisir $TE = T_2^*$, si cela n'était pas possible en une excitation. En effet, c'est à $t = T_2^*$ que les variations de signal RMN dues au signal BOLD sont les plus importantes.

La multiplication des excitations peut aussi être utilisée pour augmenter la résolution des images. En effet, si la résolution est limitée par les performances du spectromètre, on pourra utiliser les mêmes paramètres d'imagerie, et multiplier la résolution par le nombre d'excitations. Cependant, ceci réduit la taille des voxels et abaisse le rapport signal sur bruit.

On ne peut pas non plus multiplier les excitations indéfiniment, car plus on augmente le nombre d'excitations plus la séquence prend du temps, et les besoins en imagerie fonctionnelle demandent des temps de répétition courts.

Enfin, comme l'EPI multishot permet de parcourir plus rapidement l'espace réciproque, cette technique réduit les distorsions occasionnées par la faible bande passante dans la direction de phase et par les erreurs de trajectoire dues aux courants de Foucault. (cf. 4.7)

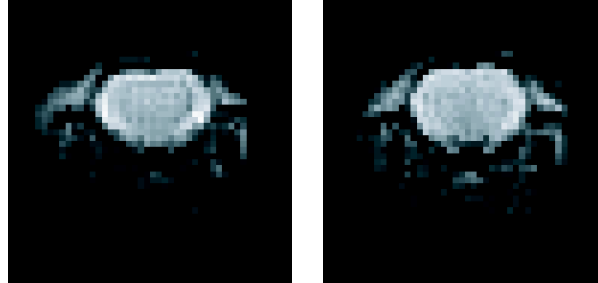


FIGURE 4.7 – Image d'une coupe de cerveau de rat par une séquence EPI single-shot (à gauche) et une séquence EPI multi-shot (à gauche).

Les deux séquences ont les mêmes paramètres IRM : $TE = 20\text{ ms}$; $TR = 2\text{ s}$; matrice 48×48 ; $FOV = 35\text{ mm}$.

On remarque une légère amélioration de l'image, en plus de pouvoir atteindre des TE plus faibles avec la séquence multi-shot.

Problèmes supplémentaires posés On voit sur la figure 4.8 que l'acquisition du plan de Fourier diffère de celle de la séquence EPI one-shot : on voit apparaître un motif dd-gg (d pour droite et g pour gauche) pour les échos, contrairement au motif dgdg que nous avons observé plus haut. Ceci fait surgir un ghost supplémentaire dans l'image. De plus, on peut remarquer que la décroissance en T_2^* n'est plus continue si on ne prend pas en compte ce phénomène à l'acquisition.

Ces phénomènes sont facilement éliminés à la reconstruction, de façon similaire aux algorithmes de reconstruction de la séquence single shot.

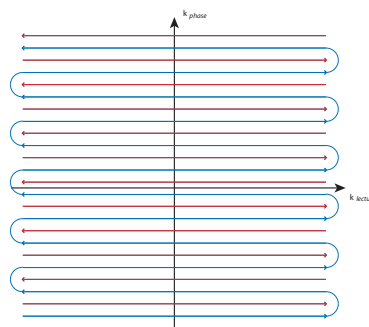


FIGURE 4.8 – Trajectoire dans l'espace-k lors d'une acquisition EPI multishot.

En bleu : premier shot

En rouge : deuxième shot, pour lequel la continuité de l'acquisition en bout de ligne n'a pas été représentée pour ne pas encombrer la figure.

4.3 Traitements statistiques en IRM fonctionnelle

4.3.1 Paradigmes et régresseurs

L'imagerie fonctionnelle cérébrale consiste à détecter les variations de signal BOLD au sein du cerveau qui sont corrélées avec un stimulus donné (figure 4.9). On appelle *paradigme* la forme d'application de ce stimulus. Généralement, on établit des paradigmes alternant deux conditions, pour ensuite effectuer un traitement statistique. Ce traitement va nous permettre de connaître les activations évoluant en rapport avec le paradigme.

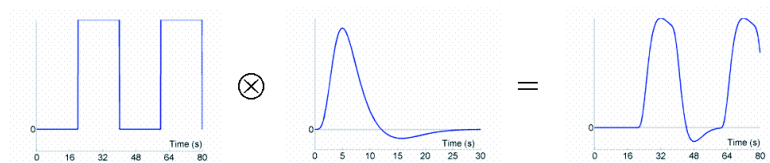


FIGURE 4.9 – La convolution du stimulus appliqué à la réponse hémodynamique impulsionnelle donne le signal BOLD recherché.

Prenons un exemple : on souhaite déterminer les zones actives par l'application d'une stimulation électrique sur un rat. On effectue une image du signal BOLD toutes les deux secondes, en alternant 15 secondes avec stimulation et l'autre sans. Un traitement statistique permet alors d'établir des cartes de corrélation entre le signal BOLD et le stimulus. Ce traitement statistique est souvent effectué grâce au logiciel SPM (développé sous Matlab) que nous allons présenter.

4.3.2 Le logiciel SPM

Le logiciel SPM (Statistical Parametric Mapping, <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>) est développé par le *Wellcome Department of Imaging Neuroscience*, Londres. Il contient de nombreuses fonctions Matlab pour l'analyse statistique en imagerie fonctionnelle cérébrale.

Il permet notamment :

- de traiter les données IRMf, EEG ou TEP ;
- d'effectuer des analyses de groupe ;
- de produire des cartes d'activation recalées sur les images anatomiques.

Le logiciel passe par plusieurs étapes pour obtenir une carte d'activation (figure 4.10) :

- **Réalignement** : Dans un premier temps SPM réaligne entre elles les images EPI obtenues, notamment pour corriger les effets du mouvement du rat.
- **Normalisation** : Grâce à une image anatomique haute résolution acquise avant ou après les EPI, on normalise toutes les images sur une carte standard afin de pouvoir effectuer des études multi-sujets.
- **Lissage** : Les traitements statistiques se basent sur la théorie des champs gaussiens. On va, pour rester dans le cadre de cette théorie, effectuer un lissage gaussien des images. Ceci a aussi comme effet de corriger la variabilité inter-sujet.

- **Traitement statistique** : On réalise sur chaque pixel un test t de Student afin d'observer les corrélations entre le signal BOLD et un régresseur.
- **Visualisation** : Enfin, on superpose la carte T seuillée et une image anatomique pour obtenir une carte d'activation.

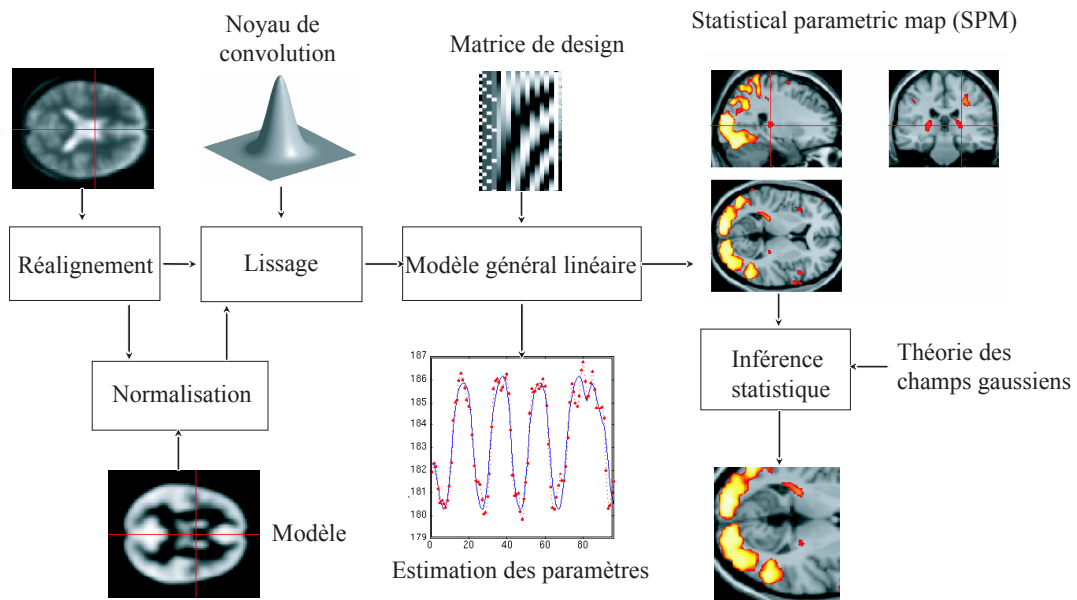


FIGURE 4.10 – Traitements effectués sous SPM : réalignement, recalage, normalisation et traitements statistiques.

4.3.3 Modélisation causale dynamique (DCM)

Nous avons vu que l'IRMf permettait de déterminer quelles zones cérébrales subissaient des modifications hémodynamiques, lorsque soumises à un stimulus déterministe extérieur. Ceci implique que l'observation des activations neuronales censées être à la base de ces changements hémodynamiques se fait de façon indirecte. Devant des « activations », il est donc virtuellement impossible de savoir si des activations neuronales ont réellement eu lieu, ou si nous observons uniquement des variations de flux sanguin cérébral. Nous verrons que dans le cas de la stimulation du nerf vague, ceci pose particulièrement problème dans la mesure où la stimulation induit des changements de rythme cardiaque, et donc de débit et de flux sanguin importants, indépendamment des activations neuronales induites.

La modélisation causale dynamique permet de valider ou d'invalidier des modèles de connectivité neuronale, sur la base de données IRMf ou EEG. Nous nous intéresserons ici à l'application de la DCM en IRMf.

L'idée sous-jacente consiste en la définition de modèles de connectivité neuronale plausibles et la confrontation à d'autres modèles mettant en jeu les mêmes structures. Les réponses hémodynamiques au stimulus extérieur sont alors simulées en fonction des connectivités définies dans les différents modèles. Ensuite les résultats de ces différents modèles sont comparés aux données temporelles acquises. (figure 4.11)

Théorie de la DCM

Le réseau neuronal est modélisé par un certain nombre d'entrées et de sorties. La ou les entrées correspondent généralement aux stimulus appliqués (qui peuvent être multimodaux). En principe, chaque entrée peut avoir une influence directe sur chacune des régions d'intérêt. Toutefois, il est d'usage de limiter l'influence directe du stimulus à une seule région.

Les sorties correspondent aux signaux mesurés en IRMf. On en recense donc une par région d'intérêt. Généralement, on récupère la moyenne du signal BOLD mesuré dans les régions d'intérêt principales, déterminées à l'aide d'une analyse statistique conventionnelle.

À chaque région sont attribuées six variables (figure 4.12). Cinq de ces variables correspondent aux variables du modèle hémodynamique présentées dans Friston et al. (2000), et ne sont donc pas spécifiques à l'analyse en DCM. Elles restent toutefois spécifiques à la région ; chaque région possède donc ses propres paramètres hémodynamiques.

La sixième variable constitue le cœur de l'analyse DCM : elle correspond à l'activité neuronale de la région concernée, et dépend des activités neuronales de toutes les autres régions d'intérêt, en fonction du modèle de connectivité défini par l'utilisateur.

Chaque activité neuronale et chaque entrée peut avoir un effet direct sur l'activité d'une autre région, ou moduler la connectivité existant entre deux autres régions.

Une fois le modèle défini, il reste à estimer les six variables de chaque région, pour faire correspondre au mieux les sorties simulées aux signaux BOLD mesurés (fig. 4.12). Une fois ces paramètres estimés, on attribue au modèle un score de plausibilité, ou évidence du modèle, déterminant si l'on a réussi ou non à modéliser la réponse obtenue avec le modèle proposé.

Il suffit enfin de comparer les évidences des différents modèles proposés, pour dégager le modèle le plus plausible et ainsi confirmer ou infirmer notre hypothèse de départ.

Enfin, il faut bien noter que la DCM ne peut être considérée comme une technique exploratoire. Il faut au préalable avoir défini des modèles basés sur certaines connaissances *a priori*, notamment en neuroanatomie.

Pour plus de renseignements, et notamment pour les bases mathématiques de la DCM, voir l'article fondateur Friston et al. (2003), ainsi qu'une revue récente Stephan et al. (2010).

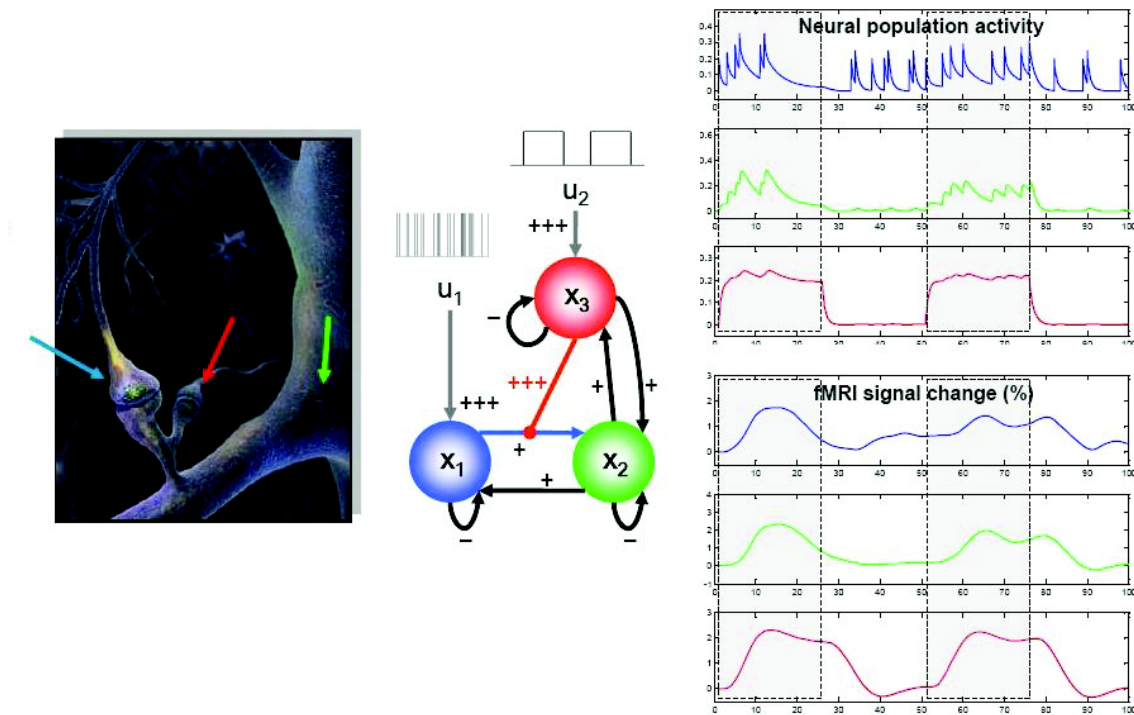


FIGURE 4.11 – Principes de la modélisation causale dynamique :

- À gauche : trois populations neuronales différentes dont on acquière les variations de BOLD par IRM.
- Au centre : modèle simulé : deux stimuli u_1 et u_2 , entrées de deux différents noyaux ; les deux amas de neurones influent à la fois sur eux-mêmes (rétroaction négative), sur les autres (inhibition ou excitation) et sur les liens entre les autres populations.
- En haut à droite : activité neuronale simulée, à partir du modèle présenté.
- En bas à droite : signal BOLD estimé à partir de modèles hémodynamiques et de l'activité neuronale simulée.

Modifié de Stephan et al. (2008).

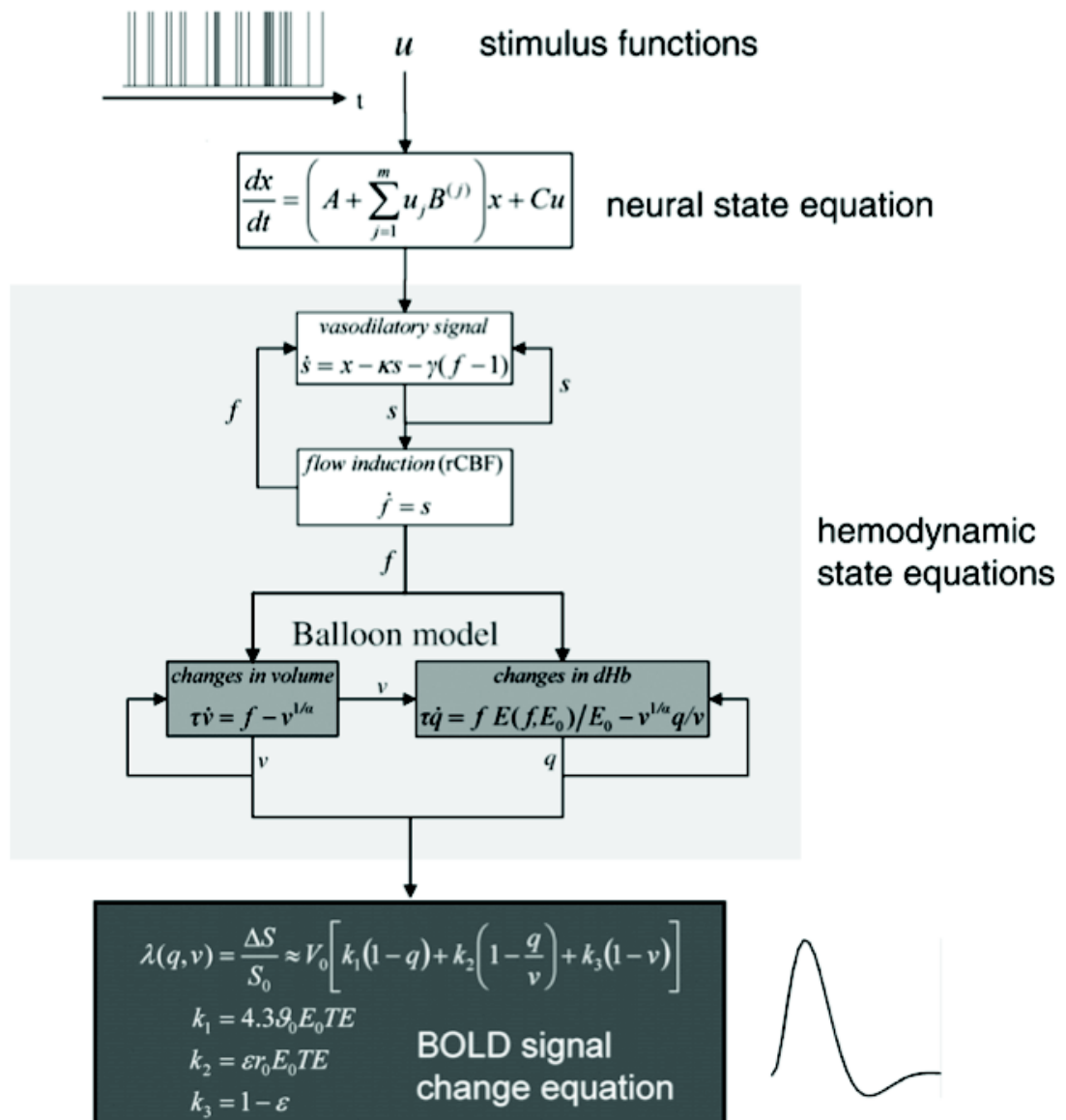


FIGURE 4.12 – Modèle hémodynamique permettant les calculs en DCM.

Le stimulus u est considéré comme la fonction d'entrée, et induit une réponse neuronale modélisée par une équation bilinéaire (*neural state equation*).

La réponse neuronale déclenche une cascade hémodynamique modélisée par quatre équations et cinq paramètres.

Les paramètres hémodynamiques sont : le taux de décroissance de la vasodilatation (κ) ; le taux d'autorégulation du débit sanguin cérébral (γ) ; la durée de transit (τ) ; l'exposant de rigidité de Grubb (α) ; et l'extraction de l'oxygène par les capillaires au repos (ρ).

Le « *balloon model* » consiste en deux équations décrivant la dynamique du volume sanguin cérébral (v) et du taux de désoxyhémoglobine (q) (en gris clair).

Les équations d'état hémodynamique sont ensuite intégrées par rapport aux paramètres d'entrée pour donner une prédiction des séries temporelles de v et q , utilisées en entrée de l'équation des variations du signal BOLD λ (en gris foncé), afin d'obtenir la prédiction de la réponse BOLD.

D'après Stephan et al. (2007).

Chapitre 5

Préparation animale : recherche d'un anesthésique

Comme il a été mentionné précédemment, le défi principal pour le développement de l'IRM fonctionnelle (IRMf) chez le petit animal est la recherche d'un anesthésique adapté. En effet, cet anesthésique doit regrouper plusieurs caractéristiques.

L'anesthésie induite ne doit pas être trop profonde, au risque de ralentir l'activité neuronale et les modifications hémodynamiques qui s'ensuivraient. Bien entendu, le mécanisme d'action de l'anesthésique utilisé doit être pris en compte afin d'élucider ces questions.

Toutefois, le rat doit être suffisamment anesthésié pour éviter tout mouvement une fois dans l'aimant. Il faut préciser que le rat est soumis à un stress important dans l'aimant. En premier lieu, le bruit occasionné par les séquences EPI est extrêmement fort ¹. De plus, pour les études en stimulation de la patte ou de la queue, le stimulus sensoriel est propice à un réveil du rat. En somme, les conditions expérimentales sont délicates étant donné l'importance de l'équipement et son caractère invasif.

Enfin, l'anesthésique utilisé doit être assez simple à utiliser pour des études longitudinales, et surtout ne pas présenter une toxicité trop importante. En effet, même si ce n'a pas été le cas durant cette thèse, certaines études IRMf imposent un suivi de l'animal lors de plusieurs expériences à plusieurs jours, voire semaines, d'intervalle. C'est pour cette raison que l'uréthane a été écarté de l'étude, bien qu'ayant montré lors d'études précédentes un bon potentiel en IRMf (Canals et al. (2008)). En effet, si ce produit est largement utilisé dans les études en électrophysiologie, il reste néanmoins cancérigène et mutagène, imposant le sacrifice de l'animal sans réveil après l'anesthésie.

L' α -chloralose (Austin et al. (2005); Williams et al. (2010)), ainsi que le curare, ont une très faible influence sur le système nerveux central, rendant leur utilisation propice aux études par IRM fonctionnelle. Ces voies ont été explorées à plusieurs reprises (Peeters et al. (2001); Spenger et al. (2000)), et le curare a été utilisé dans David et al. (2008), article présenté au

1. Les commutations de champ magnétique dans les bobines de gradient induit un mouvement de ces bobines, à des fréquences audibles. Les gradients des séquences EPI étant parmi les plus forts utilisés, le bruit est assourdissant pour une personne située à l'extérieur de l'aimant, et *a fortiori* pour le rat dans le fourreau.

chapitre 8. Toutefois, l' α -chloralose occasionne parfois des activations non-spécifiques (Weber et al. (2006)), et les deux produits requièrent une ventilation externe de l'animal, compliquant considérablement les expérimentations, et interdisant là aussi un suivi longitudinal. C'est pourquoi le curare a été écarté des études en IRMf de la stimulation électrique intracérébrale, la mise en place chirurgicale et expérimentale étant déjà particulièrement lourde.

5.1 Isoflurane

5.1.1 Utilisation en IRM

L'isoflurane est très largement utilisé en IRM, et presque exclusivement au laboratoire de thèse, car il permet une sédation et un réveil rapides, ainsi qu'une gestion de l'anesthésie en temps réel, indispensable quand la surveillance physiologique de l'animal se limite à sa température².

5.1.2 Molécule et considérations pratiques

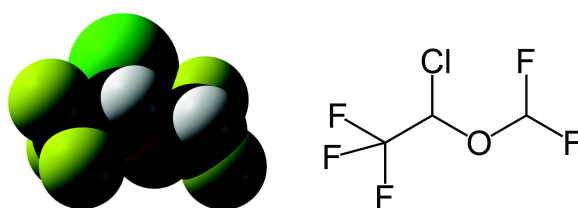


FIGURE 5.1 – Molécule d'isoflurane

L'isoflurane est un anesthésique gazeux, liquide à température ambiante et très volatil. Il est utilisé à l'aide d'une cuve à isoflurane, permettant le réglage du pourcentage de volume d'isoflurane, quel que soit le débit d'air entrant. Il peut être utilisé avec de l'air ou de l'air enrichi à l'oxygène, voire de l'oxygène pur.

Après induction de l'anesthésie dans une cage à induction, le gaz est acheminé vers le rat via un tube en plastique, et est respiré par le rat par le biais de la barre à dent. Il est d'usage d'injecter un débit suffisant pour que le mélange gazeux dans le masque soit régulièrement renouvelé.

5.1.3 Mode d'action

Le mécanisme par lequel s'effectue l'établissement de l'anesthésie est mal connu, mais on tend à penser que son effet s'applique à de multiples récepteurs et interfère avec la transmission synaptique. L'isoflurane se lie aux récepteurs GABAergiques, glutamatergiques et glyciniques, et inhibe la conduction dans les canaux potassium.

2. Ce n'est qu'au milieu de ma troisième année de thèse que le laboratoire s'est doté d'un système de surveillance physiologique complet, avec notamment une surveillance du rythme respiratoire.

L'isoflurane possède plusieurs inconvénients quant à son application en IRMf : il supprime l'activité neuronale et occasionne une vasodilatation, donc un flux sanguin cérébral accru (Masamoto et al. (2009); Kim et al. (2010)). Ces conditions rendent difficile l'observation d'augmentation du flux sanguin venant des activations neuronales. Il est donc nécessaire de trouver un compromis entre une sédation suffisante et une concentration en isoflurane suffisamment faible pour ne pas effacer les variations de BOLD (Nair and Duong (2004)).

L'induction de l'anesthésie se fait généralement avec un mélange contenant 5 % d'isoflurane, tandis que le maintien se fait à 2 %. En IRMf, l'isoflurane est souvent utilisé à des doses plus faibles qu'en temps normal, typiquement aux alentours de 1 %, afin de se placer à la limite du réveil.

5.1.4 Recueil d'enregistrements EEG sous isoflurane

Ces enregistrements sont des enregistrements EEG de scalp, effectués à l'aide d'électrodes en métal, sur des rats Wistar mâle de 300-350 g.

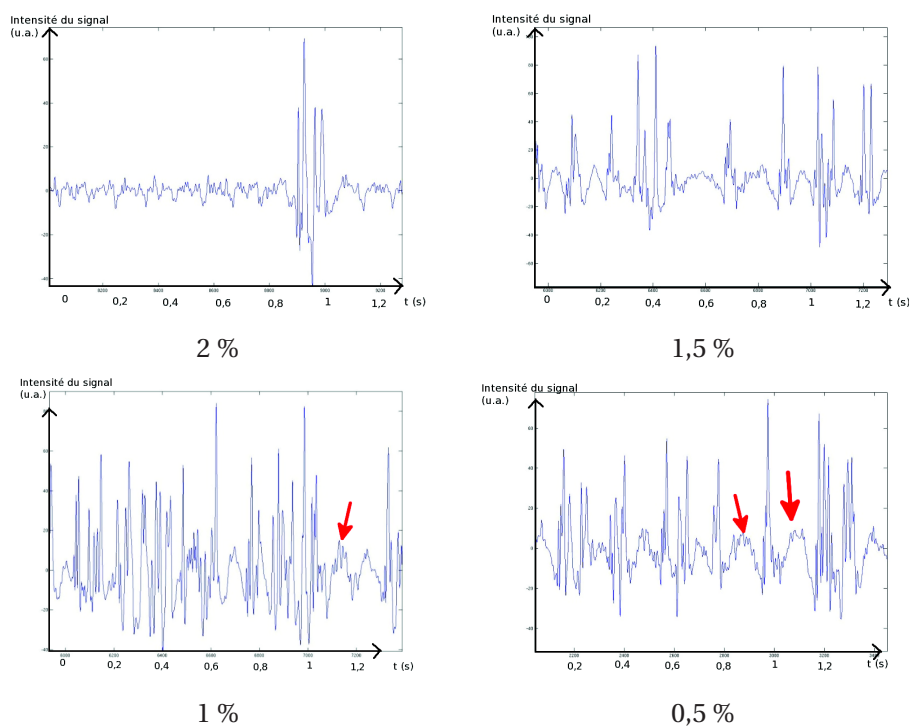


FIGURE 5.2 – Enregistrements EEG sous différentes concentrations d'isoflurane : disparition des bouffées d'ondes lentes caractéristiques d'un EEG de sommeil léger (flèches rouges) lorsque la concentration en isoflurane est augmentée.

Les pics apparaissant principalement à 1 % sont caractéristiques de l'isoflurane. À des concentrations supérieures à 2 %, on remarque un aplatissement de l'EEG, suggérant l'inhibition de l'activité neuronale et entraînant la suppression des variations de signal BOLD associées.

On observe sur la figure 5.2 l'apparition de bouffées d'ondes lentes, caractéristiques de la limite du sommeil, en-dessous de concentrations d'isoflurane de 1 %, et le tracé EEG à 0,5 % est particulièrement ressemblant à un EEG éveillé.

Cette expérience montre qu'il faudrait éviter des concentrations d'isoflurane supérieures à 0,5 % pour les études en IRMf. Ceci confirme les résultats de Nair and Duong (2004) chez la souris, qui montrent une très forte diminution des variations de signal BOLD à partir de 0,5 % d'isoflurane. Pourtant, à 0,5 % d'isoflurane, les réactions du rat sont encore trop importantes, et l'on verra apparaître lors de l'IRMf des artefacts de mouvement si l'on ne possède pas un appareil de maintien stéréotaxique corps entier pour le rat. De plus, à cette profondeur d'anesthésie, les réflexes moteurs du rat sont encore présents³, et ceci pose problème lors des expériences de stimulation électrique périphérique, où la nociception occasionnée est suffisante pour un réveil du rat dans l'aimant, ou en tout cas pour induire un fort mouvement.

De fait, la plupart des études en IRMf du petit animal se servant d'isoflurane utilisent des concentrations aux alentours de 1 %. (de Celis Alonso et al. (2012); Liu et al. (2004); Kim et al. (2010))

5.2 Kétamine

5.2.1 Molécule et mécanismes d'action

La kétamine est un anesthésique à action rapide produisant un état nommé « anesthésie dissociative » car elle déprime certaines formations du système nerveux central (système cortico-thalamique) et en stimule d'autres (système limbique et substance réticulée). Cette molécule produit aussi une analgésie. Les réflexes pharyngo-laryngés et le tonus musculaire sont préservés.

Lorsqu'elle est utilisée à des doses anesthésiques, elle peut même avoir tendance à stimuler le système circulatoire plutôt que de le ralentir. Il est donc possible de pratiquer une anesthésie à la kétamine sans prendre de mesure de protection pour les voies respiratoires.

D'un point de vue psychopharmacologique, il s'agit d'un inhibiteur de glutamate non compétitif au niveau des récepteurs de NMDA. Cet effet est observé principalement au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal. (Porro et al. (2004))

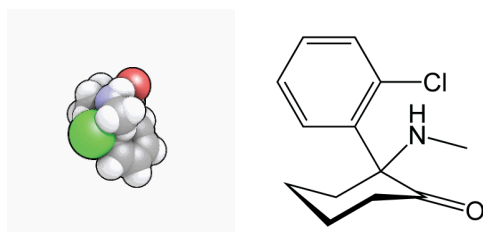


FIGURE 5.3 – Molécule de kétamine

3. Un test classique de la profondeur de l'anesthésie est le pincement de la peau entre les doigts de la patte inférieure du rat. Généralement, si l'anesthésie est trop superficielle pour de la chirurgie, on observe une rétraction du membre. Ici, on souhaite au contraire l'anesthésie la plus superficielle possible, et le réflexe moteur est un bon signe.

5.2.2 Utilisation et enregistrements EEG sous kétamine

La kétamine est utilisée pour la chirurgie du rat en complément d'un autre anesthésique, comme la xylazine, car la sédation à la kétamine seule est insuffisante. La xylazine étant beaucoup trop puissante pour être utilisée en IRMf, j'ai effectué les investigations EEG avec la kétamine seule, à des doses occasionnant un endormissement léger.

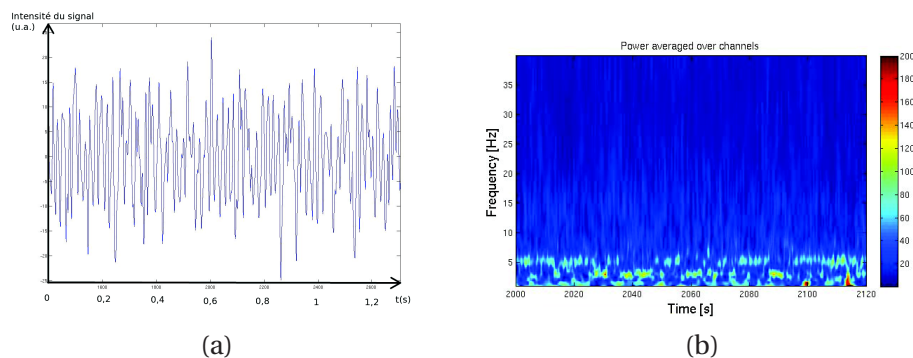


FIGURE 5.4 – Enregistrements EEG (a) et diagramme temps-fréquence correspondant (b) lors d'une anesthésie peu profonde sous kétamine.

Les variations à haute fréquence correspondent principalement à des tremblements du rat, dus à la kétamine, observés pendant les enregistrements.

Utilisée seule, la kétamine n'arrive pas à faire disparaître les mouvements du rat. Ces mouvements consistent en de très faibles tremblements de tout le corps à de grandes fréquences. Ceci a considérablement pollué les enregistrements EEG, comme on peut le voir sur la figure 5.4. De plus, ces mouvements rapides constituent une énorme source d'erreur en IRMf.

Pour ces raisons, peu d'études ont été menées en IRMf du petit animal sous anesthésie à la kétamine (Shih et al. (2008)), et cette molécule n'a pas été retenue pour cette thèse. On citera aussi une étude comparant anesthésie à l'isoflurane et à la kétamine chez le primate non humain pour des applications en IRMf : Wey et al. (2011).

5.3 Médétomidine

Récemment, le Domitor®, nom industriel de la médétomidine, a été remplacé par le DexDomitor®. Ce dernier correspond à l'énantiomère dextrogyre de la médétomidine, tandis que le Domitor® est un mélange racémique des deux énantiomères. L'énantiomère lévogyre semble n'avoir aucune incidence biologique. Les deux produits sont donc les mêmes, à part leur relation dose/effet, et tout a été fait par le laboratoire (Pfizer®) pour faciliter la transition. En effet, les doses à injecter en volume sont les mêmes, pour un effet similaire.

Dans la suite de ce paragraphe je parlerai donc simplement de médétomidine pour simplifier la lecture.

5.3.1 Molécule et mécanismes d'action

La médétomidine est un α_2 -agoniste utilisé en anesthésiologie vétérinaire. Elle est l'un des sédatifs les plus puissants de sa classe. Elle possède une activité sympatholytique⁴. Elle est utilisée en médecine vétérinaire comme sédatif, analgésique et myorelaxant.

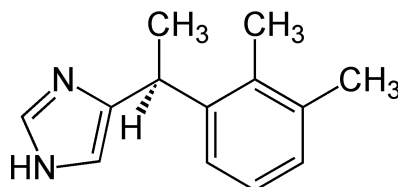


FIGURE 5.5 – Molécule de dexmédétomidine.

La médétomidine agit sur les récepteurs adrénergiques α_2 localisés dans le système nerveux central et le cœur. Elle diminue la libération de noradrénaline et provoque une inhibition du système nerveux sympathique. Ainsi, la médétomidine est responsable d'une diminution de la vigilance, de la nociception et du tonus musculaire. À l'étage cardiaque, elle provoque une bradycardie : la fréquence cardiaque diminue de 40 à 50% par rapport aux valeurs habituelles.

La médétomidine agit également, mais dans une moindre mesure, sur les récepteurs adrénergiques α_1 (son affinité pour les récepteurs α_2 est 1620 fois plus grande que pour les récepteurs α_1), ce qui provoque une vasoconstriction périphérique et une hypertension.

La médétomidine est contrecarrée par des α_2 -antagonistes, préférentiellement l'atipamézole (Antisedan®). Le réveil a lieu seulement quelques minutes après l'injection de l'antagoniste, le rat explorant sa cage de façon tout à fait normale une minute après son réveil.

5.3.2 Enregistrements EEG sous médétomidine

J'ai effectué les enregistrements EEG dans les mêmes conditions que ceux des figures 5.2 et 5.4.

On remarque que l'enregistrement de la figure 5.6 correspond à un enregistrement tout à fait normal d'éveil, où l'on voit apparaître les activités neuronales. L'animal est suffisamment au repos pour qu'on ne voit pas apparaître d'artefacts de mouvement, et on ne voit pas non plus apparaître les bouffées caractéristiques de l'anesthésie à l'isoflurane.

5.3.3 Utilisation en IRMf

Comme la médétomidine n'affecte pas directement la vascularisation du système nerveux central ni l'activité neuronale, elle est un anesthésique de choix pour les études en IRMf longitudinales chez le petit animal. Un nombre croissant d'études utilisant cette molécule sont publiées (Weber et al. (2006); Pawela et al. (2008); Zhao et al. (2008b); Pawela et al. (2009); Aikarsinen et al. (2010); Williams et al. (2010); Krautwald and Angenstein (2012)).

4. Sympatholytique se dit d'un agent qui bloque les influx nerveux destinés à stimuler les contractions des muscles lisses et les sécrétions glandulaires

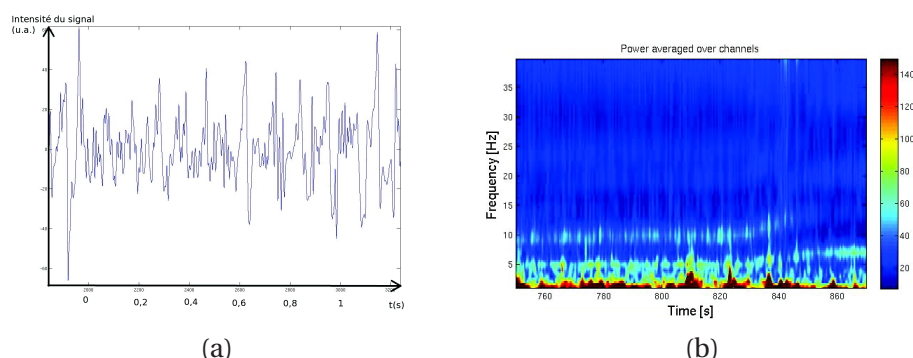


FIGURE 5.6 – Enregistrement EEG (a) et diagramme temps-fréquence correspondant (b) lors d’une anesthésie peu profonde sous médétomidine
Les variations observées suggèrent la subsistance d’une activité neuronale.

Un des intérêts de cette molécule est la possibilité d’un couplage avec une anesthésie gazeuse. En effet, il reste possible de maintenir l’animal à un bon niveau d’anesthésie, avec une bonne surveillance des paramètres physiologiques et de mouvement, en rajoutant occasionnellement 0,25 % d’isoflurane dans l’air respiré, ce qui est suffisamment bas pour ne pas rencontrer les effets indésirables de l’isoflurane.

5.4 Conclusion : choix de l’anesthésique et protocole d’anesthésie utilisé

Choix de l’anesthésique Ces quelques enregistrements EEG, couplés à quelques résultats bibliographiques, montrent bien que la meilleure molécule pour cette étude est la médétomidine, et ce pour plusieurs raisons.

- Elle permet l’obtention d’une sédation correcte, tout en gardant l’animal à la limite de la conscience.
- Elle est très simple à utiliser et permet le réveil des animaux directement à la fin des expérimentations. Surtout, elle permet les études longitudinales en IRMf, de par la non-toxicité de la molécule.
- L’anesthésie est assez reproductible, et une bonne surveillance des paramètres physiologiques permet, avec un peu d’entraînement, de connaître le niveau d’anesthésie de l’animal et éventuellement de l’ajuster grâce à l’isoflurane.

En conclusion, malgré quelques effets de la médétomidine sur les paramètres cardiovasculaire et la respiration, la simplicité de la mise en place des expériences et l’absence de danger pour l’expérimentateur, font que j’ai retenu ce candidat pour mes expériences. Toutefois, l’isoflurane a été utilisé pour les premières expérimentations en IRMf, puis le curare a été utilisé lors de la transition de l’isoflurane à la médétomidine, notamment lors des manipulations sous-tendant l’article David et al. (2008).

Préparation animale et maintien de l'anesthésie dans l'aimant Lors de toutes les expériences en IRMf du petit animal sous médétomidine, j'ai suivi le protocole suivant :

- Induction de l'anesthésie à l'isoflurane à 5 % dans une cage à induction.
- Baisse de la concentration d'isoflurane à 2 % et mise en place dans l'aimant, selon l'expérience effectuée⁵.
- Lorsque les expériences IRM sont prêtes à démarrer, injection par voie intramusculaire d'un bolus⁶ de 0,5 mL d'une solution de médétomidine préparée comme suit : 1 µL de solution commerciale de médétomidine par gramme de rat dans 10 mL de sérum physiologique⁷.
- Arrêt progressif de l'isoflurane sur 10 à 15 minutes⁸.
- 10 minutes après l'injection du bolus, démarrage d'une infusion par voie sous-cutanée de 1 mL/h de la solution préparée précédemment, jusqu'à la fin de l'expérience.
- À la fin des expérimentations, rétablissement de l'isoflurane à faible dose (0,5 %) pour calmer l'animal, puis sortie de l'aimant. Injection intramusculaire d'atipamézole, d'un volume égal au volume total de médétomidine injecté.

5. Les protocoles spécifiques aux expériences de stimulation de la patte, stimulation du nerf vague, stimulation intracérébrale ou challenge gazeux seront présentés par la suite.

6. Un bolus est une injection rapide d'un volume généralement réduit de solution.

7. La dilution permet l'injection de volumes plus facilement manipulables, ainsi que l'hydratation en continu du rat grâce au sérum physiologique. En effet, lors de longues expériences sous médétomidine, on a tendance à observer une forte déshydratation du rat, se traduisant surtout par des pertes d'urines.

8. Les protocoles publiés parlent souvent de l'arrêt de l'isoflurane au moment de l'injection du bolus, mais le risque de réveil du rat est trop important. Il faut donc diminuer progressivement l'isoflurane en surveillant les paramètres physiologiques de l'animal. Il s'agit tout de même de limiter au maximum le temps passé sous isoflurane.

Chapitre 6

Électrodes compatibles IRM

Lorsqu'on cherche à effectuer des images IRM d'un cerveau dans lequel sont implantées des électrodes, on se retrouve confronté à deux problèmes différents : des problèmes de sécurité dus à la présence d'électrodes conductrices dans un champ magnétique, et des problèmes d'imagerie dus aux propriétés magnétiques des électrodes de stimulation.

6.1 Problèmes de sécurité

L'électrode de stimulation, construite dans un matériau forcément conducteur, placée dans un champ magnétique, et *a fortiori* en présence de champs magnétiques variables (commutations de gradient) et d'impulsions radiofréquence, est parcourue par des courants induits par ces champs magnétiques. Ces courants induits occasionnent, par effet Joule, une augmentation de température, qui pourrait conduire à des effets délétères sur le tissu cérébral. Ces problèmes se posent aussi en EEG de scalp, mais les tolérances aux augmentations de température sont plus larges. De plus, le stimulateur étant implanté sous la clavicule, il sera lui aussi soumis aux mêmes champs magnétiques. Il faut donc étudier les risques de modifications de la stimulation par l'IRM.

L'utilisation de l'IRM chez des patients implantés doit donc se faire avec la plus grande prudence. A présent, on effectue sans trop de risques une IRM de patient implanté si les électrodes sont débranchées et le stimulateur désactivé, mais la question reste posée si les électrodes sont actives. En effet, l'IRM est largement utilisée en pré- et post- opératoire pour le repérage stéréotaxique et la vérification du placement des électrodes, mais pour effectuer l'IRM fonctionnelle de la stimulation cérébrale profonde, il faut pouvoir activer la stimulation à l'intérieur de l'aimant.

Il faudrait aussi étudier la possibilité de déplacement des électrodes suite au passage à l'IRM, mais cette hypothèse semble hautement improbable à la vue des procédures chirurgicales d'implantation.

Nous ne détaillerons pas le sujet, dans la mesure où ces considérations sont nettement moins critiques pour des études expérimentales chez le petit animal.

Pour plus de précisions sur les études menées pour affirmer la sécurité des patients implantés dans l'IRM : Carmichael et al. (2007, 2010); Chhabra et al. (2010); Fraix et al. (2010); Larson et al. (2008); Rezai et al. (2004); Sharan et al. (2003); Tronnier et al. (1999); Uitti et al. (2002). Quelques équipes, comme Baker et al. (2005), cherchent un moyen de limiter cette montée en température. Henderson et al. (2005) rapportent un cas de déficit neurologique acquis après l'examen IRM par un patient implanté.

Nous allons maintenant étudier en détail les différents problèmes posés par la présence d'électrodes dans le champ magnétique, puis nous verrons quelles ont été les motivations pour le choix final des électrodes utilisées pour l'IRM fonctionnelle de la stimulation électrique intracérébrale.

6.2 Problèmes liés à l'imagerie

La présence d'électrodes conductrices crée de réels problèmes en IRM. Chez l'homme, la taille et l'implantation rigoureuse et soignée de l'électrode fait que ces problèmes n'affectent qu'un faible volume autour de l'électrode.

Chez le rat, la taille du cerveau, par rapport à la taille de l'électrode qui ne peut pas être diminuée en conséquence, ainsi que l'utilisation de champs magnétiques plus importants que chez l'homme, font que tous les artefacts sont bien plus gênants.

Un premier défi pour l'IRM fonctionnelle de la stimulation cérébrale profonde est donc de choisir et de fabriquer¹ des électrodes permettant d'observer le plus grand volume de cerveau possible, tout en assurant une stimulation efficace.

6.2.1 Artefacts de susceptibilité magnétique

Les principaux artefacts observés lors de la présence de métal dans l'environnement IRM sont les artefacts de susceptibilité magnétique. Les différences de susceptibilité magnétique entre le tissu cérébral et l'électrode entraînent l'apparition d'un gradient de susceptibilité magnétique à l'interface, qui se traduit par une modification locale du champ magnétique \vec{B}_0 .

A l'intérieur d'un même voxel, les protons n'ont alors pas la même fréquence de résonance, et ce phénomène se traduit par une très forte diminution du T_2^* , ainsi qu'une déformation des images. Même sans électrodes implantées, il est très fréquent de voir ces artefacts apparaître aux interfaces air/tissu : sinus, carotides, etc. (cf. 4.2.3.2). Ces phénomènes seraient minimisés par des séquences en écho de spin, mais comme c'est le T_2^* qui permet l'observation du signal BOLD, nous devons nous borner à des séquences en écho de gradient². De plus, en EPI, le temps de lecture important dans la direction de phase accentue encore le phénomène.

1. Les électrodes utilisées chez l'homme, en plus d'être très coûteuses, sont beaucoup trop grosses pour être implantées chez le rat.

2. Il est possible de faire de l'IRMf en écho de spin, mais les variations de signal induites par les variations de BOLD sont trois fois plus faibles (Stroman et al. (2001)).

Dans le cas d'électrodes métalliques, la susceptibilité magnétique peut être multipliée par un facteur 10^6 par rapport à celle du tissu. Pour diminuer au maximum l'extension spatiale du gradient de susceptibilité magnétique, deux solutions sont à envisager : l'utilisation d'électrodes amagnétiques, ou des électrodes de diamètre extrêmement réduit.

Jupp et al. (2006) proposent d'étudier trois matériaux pour l'utilisation d'électrodes limitant l'apparition d'artefacts en IRM : le platine-irridium « compatible IRM », électrode commerciale, ainsi que le carbone et l'or, qu'ils ont fabriqué eux-mêmes.

6.2.2 Comparaison de différents matériaux amagnétiques

6.2.2.1 Critères pour le choix du matériau de l'électrode

Les différents critères observés en vue de choisir un matériau pour les électrodes de stimulation cérébrale profonde sont présentés ici par ordre d'importance :

- L'électrode utilisée ne doit pas occasionner d'artefacts trop importants sur les images IRM. N'importe quel matériau paramagnétique (ou *a fortiori* ferromagnétique) induirait, avec les séquences utilisées, la suppression du signal sur pratiquement tout le cerveau du rat. Idéalement l'électrode devrait avoir la même susceptibilité magnétique que le tissu cérébral environnant, ce qui est impossible.
- Le matériau utilisé doit permettre une implantation facile de l'électrode lors de la chirurgie. Il faut en effet une rigidité suffisante pour éviter sa déformation lors de l'entrée dans le cerveau.
- De même, il est nécessaire de pouvoir utiliser des électrodes de faible diamètre, afin d'éviter au maximum les traumatismes et hémorragies inhérents à la chirurgie.
- Enfin, l'électrode doit être conductrice pour que la stimulation soit possible. Toutefois, comme on le verra par la suite, on peut se contenter d'une conductivité assez faible, si elle reste non nulle. Ce critère n'est donc pas critique, et n'entraîne pas le rejet de l'utilisation du carbone pour la fabrication de l'électrode.

6.2.2.2 Platine-irridium

C'est le matériau généralement utilisé chez l'Homme pour les implantations d'électrodes de stimulation. Sa stabilité chimique en fait un matériau de choix pour des électrodes intracérébrales, matériau qui doit être le plus passif possible durant des dizaines d'années sans intervention. Il existe des modèles commerciaux d'électrodes bipolaires en platine-irridium « compatibles IRM ».

Malheureusement, ces électrodes créent des artefacts beaucoup trop importants pour être utilisées, comme le montre Jupp et al. (2006), et les électrodes en or et carbone induisent beaucoup moins de problèmes sur les images. Je me suis donc concentré sur les pistes de l'or et du carbone.

6.2.2.3 Or

L'or est un très bon conducteur, et est amagnétique. Ces deux propriétés en font un bon candidat, et j'ai donc testé deux diamètres différents de fil d'or : 0,1 mm et 0,25 mm, tous deux des fils cylindriques d'or pur à 99,9 % .

Le fil de 0,1 mm est beaucoup trop fin pour être manipulable, et les risques de casse sont beaucoup trop importants. De plus, il est impossible d'effectuer le contact avec le câble de cuivre allant au stimulateur. Les images IRM sont certes assez peu sensibles à la présence de ce fil, mais sa maniabilité très réduite fait qu'il ne peut pas être utilisé en stimulation cérébrale profonde.

Le fil de 0,25 mm de diamètre est plus facilement manipulable, et l'implantation de telles électrodes dans un cerveau de rat est possible. Toutefois, sur les images IRM, ce diamètre induit des artefacts de susceptibilité trop importants en EPI (figure 6.1). Tandis que Jupp et al. (2006) concluent que le choix de l'or s'impose pour des électrodes compatibles IRM, je n'ai pas retenu ce matériau, les séquences utilisées en IRMf ne permettant pas d'utiliser des électrodes trop conductrices.

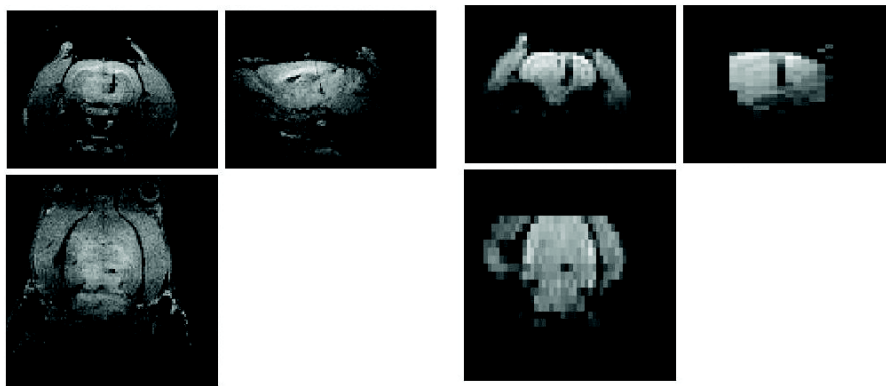


FIGURE 6.1 – Images anatomique (MDEFT) et rapide (EPI) obtenues à 2,35 T d'un cerveau de rat implanté à l'aide d'une électrode d'or. L'électrode se voit peu sur l'image anatomique, mais l'image EPI est plus impactée.

6.2.2.4 Carbone

Malgré sa très faible conductivité, le carbone pourrait être un matériau intéressant pour la fabrication d'électrodes compatibles IRM. En effet, sa susceptibilité magnétique est très faible (figure 6.2), et comme le stimulateur utilisé fonctionne en courant constant et est capable d'appliquer des tensions assez importantes, la forte résistivité n'handicape que très peu les manipulations.

De plus, l'utilisation de faisceaux de fibres de carbones est pratique d'utilisation. Il est possible d'adapter le nombre de brins utilisés et donc la taille de l'électrode, en restant toutefois dans des limites raisonnables pour garder une conductance correcte.

C'est pour ces raisons que ce sont les électrodes en carbone fabriquées par mes soins qui ont été retenues. Je présenterai dans la prochaine section les considérations pratiques à prendre en compte dans la fabrication de telles électrodes, et je détaillerai le protocole de fabrication.

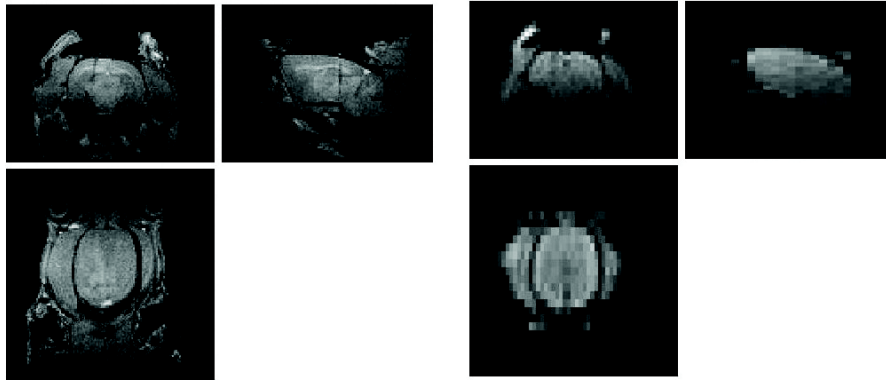


FIGURE 6.2 – Images anatomique (MDEFT) et rapide (EPI) obtenues à 2,35 T d'un cerveau de rat implanté à l'aide d'une électrode de carbone. On remarque le peu d'influence de l'électrode de carbone sur l'imagerie.

6.3 Conclusion : choix de l'électrode et protocole de fabrication

Comme nous venons de le voir, c'est le carbone qui a été choisi pour la fabrication des électrodes de stimulation cérébrale profonde. Il existe deux aspects pratiques à étudier pour la fabrication des électrodes : l'isolation de l'électrode et la rigidification des brins de carbone.

Une méthode de fabrication sophistiquée d'électrodes en carbone pour la stimulation intracérébrale a été publiée par Dunn et al. (2009). Le matériel et le personnel disponibles n'ont malheureusement pas permis l'emploi d'une méthode aussi sophistiquée.

Isolation de l'électrode En effet, nous voulons que l'électrode implantée stimule une région cérébrale bien précise, et donc ne fasse passer le courant qu'en sa pointe. Les électrodes commerciales utilisées chez l'homme comportent généralement quatre contacts et sont le fruit d'un processus de fabrication industriel. Ici, l'électrode étant constituée d'un seul et même métal sur toute sa longueur, il faut trouver un moyen d'isoler toute cette longueur, tout en supprimant cette isolation au niveau de la pointe. De plus, l'isolant utilisé doit bien sûr influencer le moins possible l'obtention d'images IRM.

J'ai utilisé, pour l'isolation des électrodes en carbone, du vernis à ongles transparent³, qui, une fois sec, se comporte comme un isolant. De plus il est neutre magnétiquement.

Rigidification des électrodes Les fibres de carbone utilisées se présentent sous la forme d'une multitude de brins de quelques dizaines de micromètres de diamètre. Afin d'obtenir une électrode d'environ 0,1 mm de diamètre, il faut donc en prendre un certain nombre, et l'amas de brins résultant se déforme bien entendu extrêmement facilement. Il a fallu trouver un moyen de souder ces brins entre eux, et de les rigidifier.

3. L'utilisation de vernis à ongles coloré est à proscrire, car les pigments contenus dans le vernis créent des artefacts en IRM.

Le 2-cyanoacrylate de méthyle (« superglu » liquide) a permis d'atteindre ce but : une fois sèche, la glu n'est pas complètement isolante. La longueur des contacts étant très courte, même une faible résistivité permet l'injection du courant dans le cerveau, grâce aux hautes tensions du stimulateur. De plus, les forces de tension superficielle tendent à écarter de façon uniforme les brins de carbone, et le tout forme un cylindre.

Protocole de fabrication Le procédé de fabrication des électrodes de stimulation au laboratoire, en vue d'une implantation chronique, s'est déroulé comme suit.

- Séparation de deux amas de brins destinés à la fabrication de l'électrode, de longueur 6 cm environ et de largeur souhaitée⁴.
- Insertion des amas dans un cathéter de longueur 4 cm et de diamètre le plus petit possible (PE10 par exemple). Des fibres de carbone doivent dépasser d'au moins 1 cm de chaque côté du cathéter.
- Apposition de la glu du côté destiné au cerveau du rat. Par capillarité, la glu va souder les brins et monter dans le cathéter, permettant ainsi de fixer les brins au cathéter.
- Les électrodes sont généralement laissées au repos entre deux et trois heures, laissant le temps à la glu de sécher avant la suite des manipulations⁵. On obtient alors l'électrode de la figure 6.3.
- Avant l'insertion de l'électrode, une incision oblique est faite au cutter afin de couper l'électrode à la distance souhaitée (l'extrémité du cathéter arrivant en butée sur le crâne de l'animal, cette longueur correspondant à la profondeur de la cible dans l'atlas de Paxinos : Paxinos and Waxton (1997)). Cette incision permet aussi d'enlever le vernis isolant au bout de l'électrode, rendant cette dernière conductrice à son extrémité.
- Les électrodes sont prêtes. Afin de vérifier leur bon fonctionnement, il suffit d'insérer leurs extrémités dans du sérum physiologique, puis d'appliquer une tension continue (pile 9 V). L'hydrolyse provoque un dégagement gazeux aux niveaux des deux électrodes. Ceci permet de tester à la fois la bonne conductance des électrodes et l'isolation sur la longueur de l'électrode (les bulles ne doivent apparaître qu'aux endroits « dénudés »).

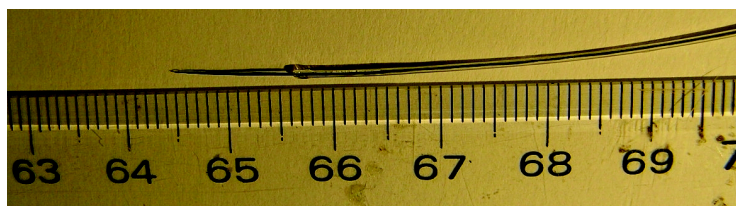


FIGURE 6.3 – Electrode en carbone destinée à une implantation intracérébrale chez le rat, avant incision à la longueur souhaitée.

4. L'ajout de glu augmente le diamètre de l'amas de brin de 20 % environ.

5. La préparation des électrodes est faite la veille de la chirurgie, de manière à avoir une électrode stable au moment de la chirurgie.

Troisième partie

Résultats en IRM fonctionnelle chez le rat

Chapitre 7

Validation des procédures d'IRMf chez le petit animal : hypercapnie et stimulation de la patte

7.1 Modifications du couplage neuro-vasculaire : hypercapnie

Dans un premier temps, des études exploratoires de vasoréactivité ont été effectuées. Ces dernières consistent à faire respirer du CO₂ au rat de façon contrôlée. En effet, le CO₂ a un fort effet vasodilatateur et induit donc une augmentation importante du signal BOLD dans tout le cerveau.

Cette expérience a plusieurs avantages :

- Les variations de signal BOLD occasionnées sont beaucoup plus importantes que celles induites par les activations neuronales, et sont donc plus facilement observables.
- L'anesthésie sous isoflurane est envisageable pour cette manipulation, car même si elle diminue de façon significative les variations de signal BOLD (Sicard et al. (2003); Masamoto et al. (2009)), si l'on prend garde à rester à des concentrations de l'ordre de 1,5 %, l'effet BOLD est si important qu'il reste détectable, tout en assurant une bonne anesthésie.
- L'hypercapnie a un effet sur le cerveau entier, et cet effet est hétérogène : des régions cérébrales répondent plus que d'autres. (Sicard et al. (2003); Kannurpatti et al. (2003))

Ces avantages permettent l'utilisation de challenges gazeux pour le développement de l'imagerie et du traitement statistique. En effet, les effets sont facilement observables, et on réduit ainsi le nombre de facteurs pouvant poser problème (stimulation, anesthésie, ...).

Protocole Les manipulations d'IRM de l'hypercapnie, effectuées à 7 T, se sont déroulées ainsi :

- Le rat est placé dans le berceau, avec barres d'oreilles et barre à dent, et sa température est contrôlée par une sonde rectale couplée à un chauffage par circulation d'eau situé dans le berceau. L'air est acheminé par un tube arrivant dans la barre à dent.
- Les paramètres d'imagerie et les séquences utilisés sont ceux présentés à la section 7.2.2 de ce chapitre, sauf la session IRMf, qui dure 15 minutes (tous paramètres égaux par ailleurs).

- Lors de ces 15 minutes, 5 minutes (100 TR) sont destinés à l'acquisition de la ligne de base, puis l'air est enrichi de 5 % de CO₂ pendant 5 minutes (100 TR). Enfin, le CO₂ est arrêté, permettant d'acquérir pendant les 5 dernières minutes (100 TR) le retour à la ligne de base.
- Enfin, le rat est sorti de l'aimant et peut retourner en salle de réveil.

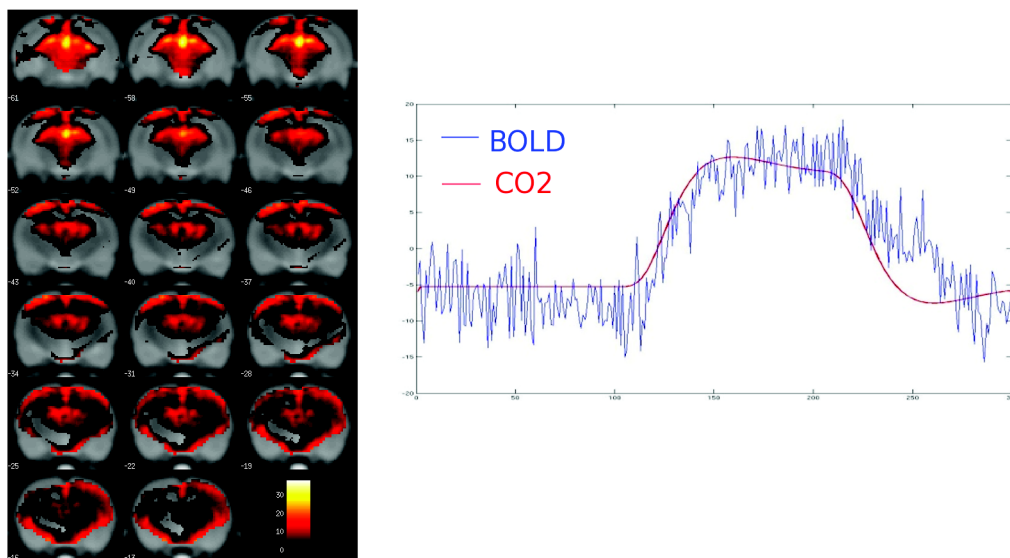


FIGURE 7.1 – Variations de signal BOLD suite à un challenge gazeux sous un champ de 7 T.
 À gauche : carte statistique des corrélations avec une fonction stimulus (en rouge à droite), corrigée FWE ($p < 0,005$).
 À droite : déroulé temporel du signal BOLD moyenné sur une région d'intérêt activée (en bleu) et concentration en CO₂ supposée (en rouge, cf. infra)

La présence de l'aimant impose que la bouteille de CO₂ soit située hors de la salle de l'aimant. Cela implique que de longs tuyaux séparent la bouteille de l'animal. Malgré tous les efforts employés, un capnomètre placé au niveau du rat ne mesure l'augmentation de CO₂ qu'après une dizaine de secondes. De plus, le rat met un certain temps à assimiler le gaz envoyé, et la pression partielle en CO₂ (p_{CO_2}) n'augmente que progressivement (sur deux minutes environ).

Les fronts montant et descendant que nous aimerions utiliser comme régresseur ne sont pas mesurables, et le traitement statistique a été effectué par rapport au régresseur de la figure 7.1 (en rouge à droite), qui est une fonction porte filtrée par un filtre passe-bas.¹

Les résultats sont exposés figure 7.1 : on trouve une forte vasoréactivité de toutes les régions corticales et du thalamus, et on observe des variations de signal BOLD de l'ordre de 15 %, bien plus importantes que celles occasionnées par des activations neuronales (5 % maximum).

1. Les variations de signal étant lentes, il faut porter une attention particulière au filtrage passe-haut effectué par SPM : lors de la spécification du modèle, le temps caractéristique du filtrage a été fixé à 2048 s.

En conclusion, les tests d'hypercapnie ont permis de tester et perfectionner les séquences IRMf, en étant peu sensible à la préparation animale, et ne comportant pas de stimulation électrique. La prochaine étape est logiquement de commencer à stimuler le rat pour se rapprocher des paradigmes IRMf finaux (stimulation cérébrale profonde).

7.2 IRM fonctionnelle de la stimulation électrique de la patte

Dans cette section seront présentés les études IRMf réalisées sur la stimulation électrique de la patte arrière gauche d'un rat. Comme nous l'avons déjà signalé, ces études seront l'occasion de régler les dernières subtilités de la préparation animale et de l'anesthésie, sans être perturbées par la présence d'électrodes de stimulation profonde dans le cerveau à imager. De plus, l'IRMf de la stimulation électrique de la patte a été déjà couverte dans la littérature (Nair and Duong (2004); Spenger et al. (2000); Austin et al. (2003); Zhao et al. (2008a); Lahti et al. (1999)).

Les protocoles des sessions IRM sont détaillés ici. Ces protocoles ont été ceux utilisés en stimulation de la patte et en stimulation cérébrale profonde.²

7.2.1 Mise en place du rat dans l'aimant

Le choix de l'anesthésique, ainsi que protocole d'anesthésie utilisé en IRMf, a été détaillé au chapitre 5. Nous détaillons ici la mise en place du rat dans l'aimant IRM, en vue de l'IRMf de la stimulation périphérique et de la stimulation électrique intracérébrale. Seul le placement des électrodes de stimulation diffère entre ces deux techniques. Un grand soin a été apporté à la reproductibilité de la manipulation, au vu du nombre conséquent de paramètres susceptibles de varier.

- Au moment de la mise en place, le rat est sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane à 2 %, baissée progressivement jusqu'à 0 % après injection de la médétomidine (cf. protocole d'anesthésie, section 5.4). L'anesthésie gazeuse est acheminée par un tube longeant le berceau par un trou situé dans la barre à dent, tandis que la médétomidine et le sérum physiologique sont injectés par le biais d'un cathéter relié à une seringue montée sur pousse-seringue.
- Le berceau utilisé comporte des tuyaux d'eau servant à la régulation de la température corporelle de l'animal, et la température est contrôlée par une sonde rectale.
- Un système de monitoring (Biopac®) permet le contrôle de plusieurs paramètres physiologiques. La fréquence respiratoire du rat est mesurée grâce à une ceinture abdominale et un capteur de pression. L'électrocardiogramme est acquis via des électrode en or, fixées aux pattes avant gauche et arrière droite par bande adhésive. Le contact entre l'électrode et la peau se fait grâce à un gel conducteur.
- **Stimulation de la patte** : Insertion d'électrodes sous-cutanées (aiguilles de seringue) au niveau de la patte arrière gauche. Ces électrodes sont ensuite reliées à l'unité d'isolation à courant constant (cf. 7.2.3).
- **Stimulation cérébrale profonde** : Les électrodes de stimulation (cf. 6.3) sont reliées par de la glu à des fils eux-mêmes reliés à l'unité d'isolation à courant constant (cf. 7.2.3).
- Mise en place de l'antenne de surface sur la tête du rat.
- Le berceau peut enfin être rentré dans l'aimant, et le protocole d'imagerie peut alors commencer.

2. Les protocoles concernant la stimulation du nerf vague se trouvent pages 99 et 100.

7.2.2 Paramètres d'imagerie

Le protocole d'imagerie sur le 4,7 T, sur lequel se sont déroulées les expériences IRMf, se déroule comme suit :

- Mise en place précise du berceau grâce à une séquence rapide FLASH sur 3 coupes orthogonales.
- Accord et adaptation des antennes de volume et de surface.
- Acquisition d'une carte de champ.
- Procédure automatique de shim (homogénéisation du champ magnétique statique \vec{B}_0) avec MapShim (Bruker). À la fin de cette procédure, un écart-type d'environ 50 Hz est atteint sur le cerveau entier.
- Séquence d'imagerie anatomique : séquence RARE ; TE = 13,125 ms ; TE_{effectif} = 52,5 ms ; TR = 5800 ms ; RARE factor = 8 ; temps d'acquisition : 3 min 30 s. Ces paramètres d'imagerie correspondent au template de rat fourni par Schweinhardt et al. (2003), qui a été utilisé pour la normalisation des images sous SPM.
- Une fois les paramètres physiologiques stabilisés, des sessions IRMf de 10 minutes chacune sont lancées. La séquence est la suivante : EPI en écho de gradient multi-coupes couvrant tout le cerveau (25 tranches contigües de 1 mm d'épaisseur) ; TE = 30 ms (position de l'écho à 33 % de la fenêtre d'acquisition, sans zero-filling) ; TR = 3 s ; BW = 200 kHz ; angle de basculement de 75° ; FOV = 25,6 × 25,6 mm² ; matrice de 64 × 64, donnant une résolution spatiale de 0,4 × 0,4 × 1 mm³. Les paramètres de stimulation utilisés lors de ces séquences sont détaillés en 7.2.4 et 10.4.2.

7.2.3 Stimulateur utilisé

Le stimulateur utilisé, tant pour la stimulation de la patte que la stimulation cérébrale profonde, est un stimulateur A310 (World Precision Instruments), couplé à une unité d'isolation à courant constant A385 du même constructeur (figure 7.2).

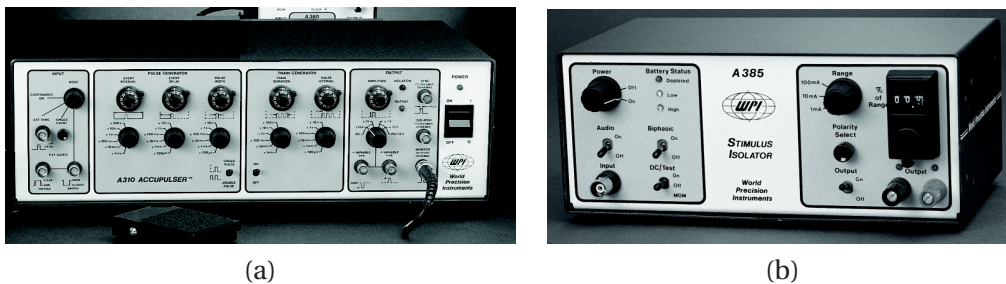


FIGURE 7.2 – Stimulateur A310 (a) et unité d'isolation à courant constant A385 (b) utilisé lors des expériences de stimulation de la patte et de stimulation cérébrale profonde.

Stimulateur Le stimulateur permet de définir un certain nombre de réglages pour la création du paradigme de stimulation :

- **Entrée** Le déclenchement de la stimulation peut se faire de différentes manières :
 - *Mode continu* : la stimulation est effectuée sans interruption. Ce mode n'a aucun intérêt en IRMf.
 - *Synchronisation externe* : un train d'onde est déclenché à chaque impulsion entrante. Ceci pourrait être intéressant pour une synchronisation avec l'imagerie, mais un étage

de comptage est alors nécessaire pour déclencher la stimulation tous les x TR.

- *Déclenchement par l'utilisateur* : ce mode déclenche un train d'onde à chaque pression sur un bouton. C'est ce mode qui a été utilisé en mode « manuel » lors des manipulations.
- **Premier étage : génération d'impulsions** Cet étage n'est pas utilisé en déclenchement manuel.
- **Second étage : paramètres du train d'onde** Cet étage permet de régler la durée du train d'onde, la fréquence des impulsions ainsi que leur durée.
- **Sortie** Cet étage dispose d'une sortie vers l'unité d'isolation, ainsi que d'une sortie pour visualiser le train d'ondes sur oscilloscope.

Unité d'isolation L'unité d'isolation fonctionne sur batteries est placée à côté de l'aimant, à une distance suffisante pour ne pas être attirée par le champ magnétique. Elle est reliée au stimulateur (situé hors de la pièce de l'aimant) par un long câble coaxial. La longueur de ce câble n'est bien sûr pas critique car seul un signal de synchronisation est porté par ce dernier. Ce système convient donc très bien à une utilisation en IRM.

Le seul réglage à effectuer sur l'unité d'isolation est l'intensité du courant. L'unité permet l'inversion de la polarité des impulsions, et émet un signal sonore lorsque l'impédance des électrodes est trop importante, indiquant généralement une perte de contact à un endroit — à déterminer — de la chaîne de stimulation isolateur → rat.

7.2.4 Paramètres de stimulation de la patte

Lors des expériences en stimulation de la patte, les paramètres de stimulation utilisés ont été modifiés à de nombreuses reprises en vue d'une optimisation.

Les trains d'ondes utilisés lors des résultats présentés ci-dessous sont de fréquence 3 Hz et de largeur d'impulsion 1 ms. L'intensité de stimulation est de 1 mA.

Le protocole IRMf consiste en l'application d'un train d'ondes de durée 15 s toutes les minutes, pendant 5 ou 10 minutes selon les acquisitions. La ligne de base est acquise pendant 30 secondes avant la première stimulation.

7.3 Résultats

La figure 7.3 montre un résultat obtenu lors de l'IRMf de la stimulation de la patte arrière gauche. D'après l'atlas de Paxinos³, la zone activée correspond approximativement à S1HL, région du cortex somatosensoriel responsable des membres inférieurs.

Tous les rats ayant présenté des variations de signal BOLD corrélées aux stimuli ont vu s'activer uniquement cette zone. Aucun rat n'a présenté d'activation non-spécifique, comme cela est souvent le cas lors d'anesthésie à l' α -chloralose (Weber et al. (2006)).

3. L'étape de normalisation des images IRM a permis de replacer les images du cerveau du rat dans le système de coordonnées stéréotaxiques de Paxinos.

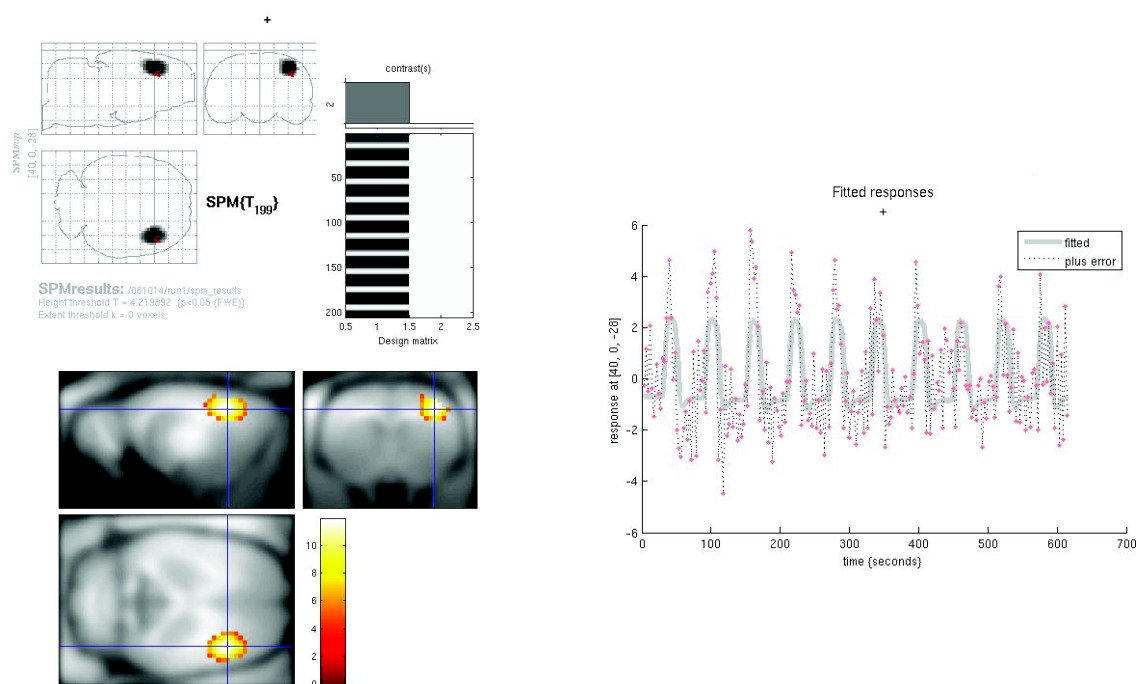


FIGURE 7.3 – Activations en IRMf de la stimulation de la patte (correction FWE, $p < 0.05$) :
 En haut à gauche : MIP (maximum intensity projection) des activations obtenues
 En bas à gauche : Activations sur 3 coupes orthogonales
 À droite : Décours temporel du voxel sélectionné (en pointillés) et régresseur utilisé (en gris : convolution de la fonction stimulus et de la HRF)

Sur la droite de la figure 7.3, on voit que le signal BOLD augmente dans la région d'intérêt d'environ 5 % lors de la stimulation de la patte, à comparer aux 2 voire 3 % de bruit IRM et physiologique en période de repos. En effet, la principale raison de l'échec d'une session IRMf est certainement ce bruit important qui noie souvent les variations de signal BOLD.

7.4 Conclusion

Malheureusement, le temps a manqué pour effectuer des mesures plus complètes, notamment sur les paramètres de stimulation. Toutefois, de telles études ont déjà fait l'objet d'un certain nombre d'articles. Dans la mesure où les paramètres de stimulation optimaux en stimulation de la patte ne sont certainement pas les mêmes que pour la stimulation intracérébrale, une fois les protocoles de préparation animale et d'imagerie fonctionnelle opérationnels, il me fallait tester d'autres stimulations.

Pour conclure, ces manipulations d'hypercapnie et de stimulation de la patte ont permis de mettre au point la technique d'IRM fonctionnelle du petit animal au laboratoire. Comme nous l'avons déjà signalé, assez peu de travaux sont entrepris dans ce domaine. Ces travaux se concentrent logiquement sur les problématiques que nous venons de citer – imagerie, anesthésie, paramètres de stimulation, ... – et utilisent pour la plupart des techniques standards d'analyse statistique.

Pourtant, vue la difficulté de faire émerger des activations neuronales claires et précises par l'observation du signal BOLD, il serait intéressant d'utiliser ces données acquises pour les traiter avec des méthodes de connectivité fonctionnelle. C'est pourquoi je présente dans la suite de ce manuscrit un article paru en 2008, montrant la possibilité d'appliquer la technique de modélisation causale dynamique (DCM) à l'IRMf du rat afin de faire émerger les connectivités fonctionnelles de réseaux neuronaux dans le contexte d'une activité épileptique, comportant de larges populations de neurones qui déchargent conjointement.

Puis, dans le chapitre 9, je présenterai une étude réalisée sur l'IRMf de la stimulation du nerf vague, où, là aussi, la DCM a permis de dégager des conclusions sur des connectivités fonctionnelles, alors que les signaux correspondants étaient noyés dans de puissants phénomènes hémodynamiques simultanés.

Enfin, je présenterai les résultats obtenus en IRMf de la stimulation cérébrale profonde, pour finir par une conclusion générale sur les considérations méthodologiques en IRMf du petit animal.

Chapitre 8

Validation de l'IRMf/EEG chez le GAERS

8.1 But de l'étude

Comme nous l'avons vu, le principal inconvénient de l'IRMf est sa résolution temporelle médiocre. Des méthodes statistiques novatrices et prometteuses pourraient permettre de pallier cette mauvaise résolution temporelle, et notamment la technique de modélisation causale dynamique (DCM), présentée en 4.3.3.

L'étude présentée dans ce chapitre permet la validation de cette méthode grâce au couplage à des enregistrements électro-encéphalographiques (EEG), qui possèdent, eux, une excellente résolution temporelle. L'EEG permet alors de détecter correctement la survenue des activations neuronales. La DCM permet ensuite de faire le lien entre ces activations obtenues par EEG et les modifications vasculaires engendrées mesurées par IRMf, en définissant un modèle de connectivité neuronale.

Cette étude avait aussi pour but la validation des séquences EPI développées sur l'aimant 2,35 T, sur lequel les premières manipulations ont été effectuées. En effet, les crises épileptiques engendrent d'importantes modifications neuro-vasculaires faciles à détecter. Il s'agit alors de vérifier que de telles variations de signal soient en effet détectables par EPI dans le cerveau entier, dans la mesure où ces modifications se produisent de façon concomitante dans plusieurs zones, distantes les unes des autres.

8.2 Travail effectué

Les manipulations se trouvant dans cet article ont été effectuées lors de mes premiers mois de thèse. J'ai principalement pris part à la partie imagerie de cette étude, notamment par la création et l'optimisation des séquences d'EPI multishot ayant servi à effectuer les mesures par IRM présentées dans l'article (cf. 4.2.5).

En effet, l'imagerie a été effectuée après injection d'un agent de contraste (Sinerem®) diminuant de façon conséquente le T_2^* . Ainsi, l'utilisation de séquences multishot permettant d'abaisser significativement le temps d'écho TE était indispensable.

8.3 Modèle expérimental utilisé : le GAERS

Le rat GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg) utilisé dans cet article est un modèle isomorphe et prédictif d'épilepsie-absence humaine (Vergnes et al. (1982)). Dans ce modèle, les rats présentent spontanément des décharges de pointe-ondes (DPO) bilatérales, synchrones et symétriques d'une fréquence de 7 à 11 Hz (Marescaux et al. (1992b)). Ces crises sont non-convulsives et se produisent toutes les minutes, pour une durée moyenne de 20 s.

Du point de vue pharmacologique, les DPO du GAERS sont supprimées par les antiépileptiques efficaces sur les absences humaines mais aggravées par les composés spécifiques des crises focales (Marescaux et al. (1992a)). Des études en électrophysiologie menées sur différents modèles animaux d'épilepsie-absence, ont montré qu'une activité oscillatoire anormale de la boucle thalamo-corticale est à l'origine des absences (Danober et al. (1998)).

Des pistes sont actuellement à l'étude pour le contrôle des crises d'épilepsie des GAERS par stimulation cérébrale profonde. La stimulation asservie de certains noyaux des ganglions de la base, notamment la substance noire réticulée, permet la réduction de la fréquence des crises, voire leur arrêt si le début de la crise est correctement détectée en EEG. (Feddersen et al. (2007); Saillet et al. (2009, 2012); Nelson et al. (2011))

8.4 Perspectives

Cet article a permis d'effectuer un grand pas en avant dans la validation expérimentale de la capacité de la DCM à déduire les structures des réseaux neuronaux à partir de données IRMf. Toutefois, la résolution spatiale de l'EEG de scalp utilisé dans cette étude est particulièrement médiocre, et de nouvelles études utilisant des approches plus invasives, comme de l'électrophysiologie in vivo, permettraient des investigations plus poussées.

Les séquences d'imagerie rapide développées sur l'aimant 2,35 T ont obtenu des résultats satisfaisants, et il allait alors être possible de les utiliser pour détecter des variations hémodynamiques plus fines et plus localisées.

Cependant, seules quelques manipulations préliminaires ont pu être effectuées sur l'aimant 2,35 T avant le déménagement de l'équipe dans de nouveaux bâtiments, et il a fallu par la suite réimplémenter les séquences sur les nouveaux aimants Bruker, même si ceci a été largement facilité par la modernité de ces derniers et les séquences qui y étaient préinstallées.

8.5 Article n° 1 : Identifying Neural Drivers with Functional MRI : An Electrophysiological Validation

Identifying Neural Drivers with Functional MRI: An Electrophysiological Validation

Olivier David^{1,2*}, Isabelle Guillemain^{1,2}, Sandrine Saillet^{1,2}, Sebastien Reyt^{1,2}, Colin Deransart^{1,2}, Christoph Segebarth^{1,2}, Antoine Depaulis^{1,2}

1 INSERM, U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France, **2** Université Joseph Fourier, Grenoble, France

Whether functional magnetic resonance imaging (fMRI) allows the identification of neural drivers remains an open question of particular importance to refine physiological and neuropsychological models of the brain, and/or to understand neuropathophysiology. Here, in a rat model of absence epilepsy showing spontaneous spike-and-wave discharges originating from the first somatosensory cortex (S1BF), we performed simultaneous electroencephalographic (EEG) and fMRI measurements, and subsequent intracerebral EEG (iEEG) recordings in regions strongly activated in fMRI (S1BF, thalamus, and striatum). fMRI connectivity was determined from fMRI time series directly and from hidden state variables using a measure of Granger causality and Dynamic Causal Modelling that relates synaptic activity to fMRI. fMRI connectivity was compared to directed functional coupling estimated from iEEG using asymmetry in generalised synchronisation metrics. The neural driver of spike-and-wave discharges was estimated in S1BF from iEEG, and from fMRI only when hemodynamic effects were explicitly removed. Functional connectivity analysis applied directly on fMRI signals failed because hemodynamics varied between regions, rendering temporal precedence irrelevant. This paper provides the first experimental substantiation of the theoretical possibility to improve interregional coupling estimation from hidden neural states of fMRI. As such, it has important implications for future studies on brain connectivity using functional neuroimaging.

Citation: David O, Guillemain I, Saillet S, Reyt S, Deransart C, et al. (2008) Identifying neural drivers with functional MRI: an electrophysiological validation. *PLoS Biol* 6(12): e315. doi:10.1371/journal.pbio.0060315

Introduction

Distinguishing efferent from afferent connections in distributed networks is critical to construct formal theories of brain function [1]. In cognitive neuroscience, the distinction between forward and backward connections is essential in network models [2,3]. This is also important when describing how information is exchanged between different brain systems [4] and how neural coding is embedded in biological networks [5]. Such hierarchical structure is biologically grounded in the asymmetry of connections between neuronal ensembles, as suggested by computational neuroanatomy studies [6–9]. In clinical neuroscience, distinguishing neural drivers (i.e., the source of driving or forward connections in the brain—usually from deep pyramidal cells) from other brain regions is essential when trying to identify structures involved in the origin or in the control of pathological activities. Epileptic seizures are illuminating in that sense. They are characterised by paroxysmal activities which, in the case of focal seizures, originate from the “epileptic focus”, i.e., a neural network restricted to a particular cortical structure, and eventually spread to other structures of the brain [10]. The epileptic focus can thus be interpreted as a neural driver of the pathological activity.

In relation to the existence of distributed networks, theories of brain function have recently promoted the concept of functional integration [11]. Functional integration specifies that brain functions are mediated by transient changes of interactions between certain brain regions, instantiated either by autonomous mechanisms (dynamical systems operating at the limit of stability) or by the action of neural drivers reinforced by the experimental context. In

integrated neuroscience, these formal ideas have initiated a search for neural networks using sophisticated signal analysis techniques to estimate the connectivity between distant regions [4,12–18]. At the brain level, connectivity analyses were initiated in electrophysiology (electroencephalography [EEG] and magnetoencephalography [MEG]) because electrical brain signals have an excellent temporal resolution that makes them particularly amenable to such analyses. Connectivity measures in EEG and MEG [13,16] rely on the estimation of metrics of interaction that are more or less related to the notion of temporal precedence (because of propagation and synaptic delays) of the activity in the driving structure with respect to that in the driven ones.

Despite their attractive neurodynamical features, EEG and MEG studies in healthy subjects are limited by their poor spatial resolution. Functional magnetic resonance imaging (fMRI), in contrast, exhibits excellent spatial resolution and has become the method of choice for mapping brain functions. During neuronal activation, fMRI is sensitive

Academic Editor: Pedro Valdes-Sosa, Cuban Neuroscience Center, Cuba

Received: July 9, 2008; **Accepted:** November 5, 2008; **Published:** December 23, 2008

Copyright: © 2008 David et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abbreviations: CBF, cerebral blood flow; CBV, cerebral blood volume; DCM, Dynamic Causal Modelling; EEG, electroencephalography; fMRI, functional magnetic resonance imaging; FWE, Familywise Error; HRF, hemodynamic response function; iEEG, intracerebral EEG; MEG, magnetoencephalography; ROI, region of interest; S1BF, barrel field of the primary somatosensory cortex; SWD, spike-and-wave discharge

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: odavid@ujf-grenoble.fr

Author Summary

Our understanding of how the brain works relies on the development of neuropsychological models, which describe how brain activity is coordinated among different regions during the execution of a given task. Knowing the directionality of information transfer between connected regions, and in particular distinguishing neural drivers, or the source of forward connections in the brain, from other brain regions, is critical to refine models of the brain. However, whether functional magnetic resonance imaging (fMRI), the most common technique for imaging brain function, allows one to identify neural drivers remains an open question. Here, we used a rat model of absence epilepsy, a form of nonconvulsive epilepsy that occurs during childhood in humans, showing spontaneous spike-and-wave discharges (nonconvulsive seizures) originating from the first somatosensory cortex, to validate several functional connectivity measures derived from fMRI. Standard techniques estimating interactions directly from fMRI data failed because blood flow dynamics varied between regions. However, we were able to identify the neural driver of spike-and-wave discharges when hemodynamic effects were explicitly removed using appropriate modelling. This study thus provides the first experimental substantiation of the theoretical possibility to improve interregional coupling estimation from hidden neural states of fMRI. As such, it has important implications for future studies on connectivity in the functional neuroimaging literature.

mainly to changes of local perfusion and oxygen uptake by neurones [19]. fMRI therefore provides an indirect measure of neuronal activity. The dynamical properties of the technique highly depend on the neurovascular coupling that relates vascular changes to neural activity [20–22]. However, this physiological limitation, which compromises the temporal resolution (~ 2 s) of metabolic neuroimaging techniques, has not prevented careful analyses of connectivity using fMRI. Connectivity measurements with fMRI quantify either *functional* connectivity, i.e., the correlation of fMRI time series between different regions [23–25], or *effective* connectivity, i.e., coupling parameters in generative models of fMRI time series [14,15,26]. Although numerous fMRI studies have shown exciting results about brain connectivity, it remains uncertain whether fMRI can be used to identify neural drivers. This is what we propose to evaluate here, in a genetic animal model of absence epilepsy using intracerebral EEG and simultaneous EEG/fMRI recordings.

We use the Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) [27]. This animal model has been validated in terms of isomorphism, homology, and pharmacological predictability to be reminiscent of typical absence epilepsy, a form of generalised nonconvulsive epilepsy occurring during childhood in humans [28]. GAERS result from genetic selection of Wistar rats over 80 generations. Animals show spontaneous spike-and-wave discharges (SWDs) associated with behavioural arrest and slight perioral automatisms. These nonconvulsive seizures last 20 s on average and are repeated every minute when the rat is at rest. Intracerebral EEG recordings have shown that the frontoparietal cortex and ventrolateral nuclei of the thalamus play an important role in the generation and/or maintenance of these seizures [27,29]. Using local field potential and intracellular recordings, we have shown recently that SWDs originate from the perioral region of the first somatosensory cortex [30]. A similar

finding had earlier been obtained in another genetic model of absence epilepsy [31,32].

We assess in this study whether fMRI can show evidence of the first somatosensory cortex being a neuronal driver during SWDs. We provide a comparative evaluation of vector regression models (Granger causality) [33] and Dynamic Causal Modelling (DCM) [14]. A key distinction between these models is that Granger causality tests for statistical dependencies among observed (time-lagged) physiological responses, irrespective of how they are caused. In contrast, dynamic causal models represent hidden states that cause the observed data and are therefore causal models in a true sense. If the mapping between the hidden brain states and observed responses is not causal, Granger causality estimated directly from fMRI time series can be very misleading. An example of a noncausal mapping is regional variations in the hemodynamic response function (HRF) that delay hemodynamic responses in fMRI, relative to their hidden neuronal causes (see Protocol S1 for further explanation). Minimising the blurring effects of hemodynamic variability using explicit [34] or implicit (such as in DCM [14]) deconvolution techniques is thus the key aspect of any functional connectivity analysis using fMRI. This paper provides the first, to our knowledge, experimental substantiation of the theoretical possibility to estimate, in fMRI, functional connectivity from hidden neural variables and therefore demonstrates the *raison d'être* for DCM and other deconvolution techniques.

Results

Our data analysis involved three distinct components. First, we characterised the hemodynamic response to seizure activity using conventional statistical parametric mapping to identify regionally specific responses. To motivate subsequent analyses of coupling, we then characterised the regional variations in the hemodynamic responses by optimising the parameters of a hemodynamic model for different regions of interest (ROIs) separately. The second component of our analyses comprised a comparative evaluation of Granger causality, before and after deconvolution of hemodynamics, and DCM using key regions identified by the whole brain analyses above. We assessed the significance of directed functional connectivity estimated from the Granger causality measure using surrogate data that removed local time dependencies between regions. To address the equivalent issue with DCM, we used Bayesian model comparison. This entailed comparing a set of models with different directed connections and identifying the model with the largest evidence. The third set of analyses provided an experimental validation of the model selection by analysing directed coupling using intracerebral EEG (iEEG) from the same regions. We used two complementary approaches for cross-validation. First, a simple characterisation of propagation delays, using event-related responses (time-locked to SWDs), enabled us to examine the latency of propagation on a millisecond by millisecond level and establish the direction of connections through temporal precedence. Second, in a series of more elaborate analyses, we used asymmetries in directed generalised synchrony. Using these invasive electrophysiological data, we were able to identify a network model that served as a reference to validate fMRI connectivity analyses.

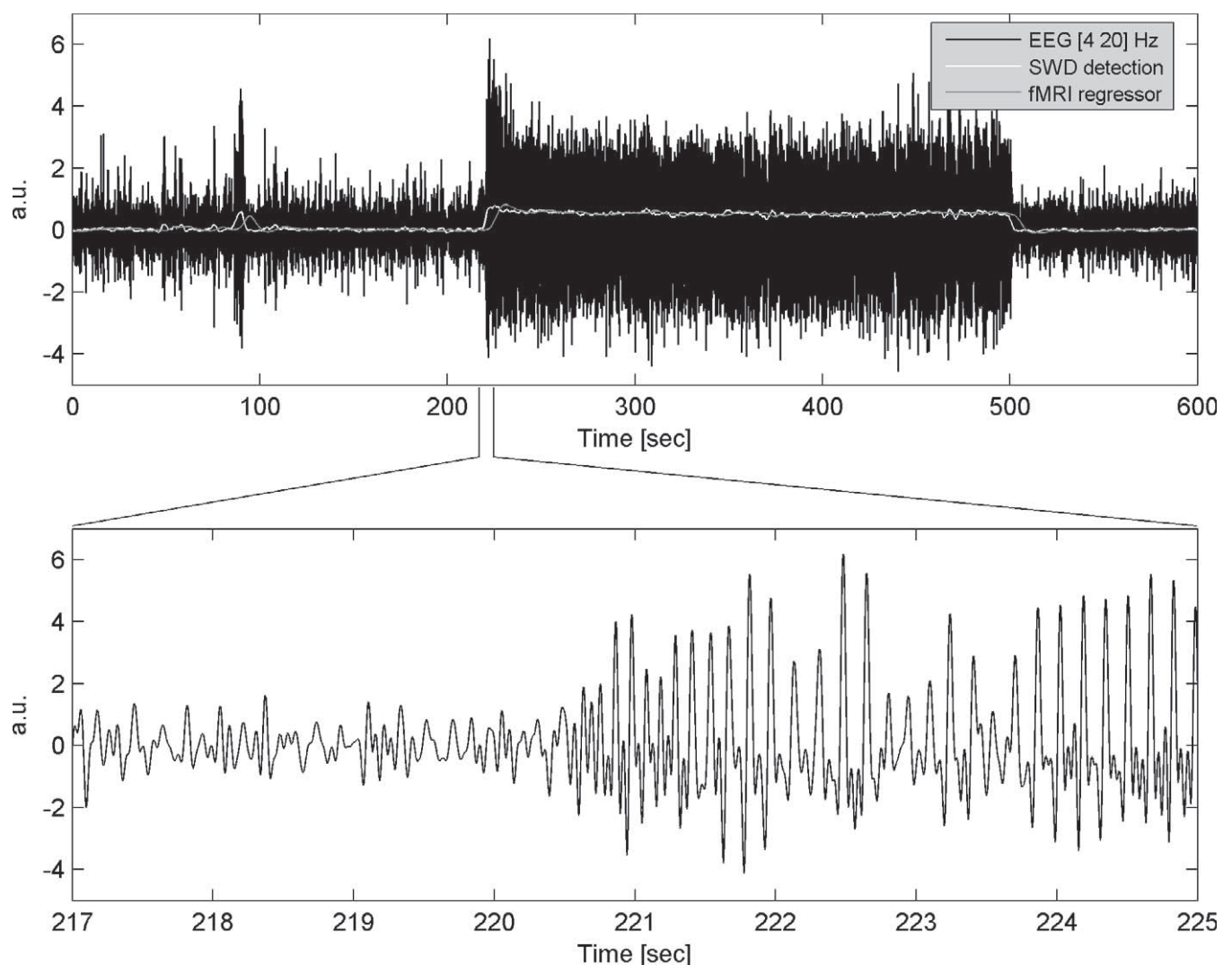


Figure 1. EEG Preprocessing

Upper panel: black (“EEG [4 20 Hz]”): 15 min of EEG recordings (band-pass filtered between 4 and 20 Hz) during EPI acquisition obtained in one rat. White (“SWD detection”): EEG power in the 4–20 Hz range (shifted to zero in between SWDs). Grey (“fMRI regressor”): previous EEG power convolved with a canonical HRF. Lower panel: short time window showing the EEG at seizure onset.
doi:10.1371/journal.pbio.0060315.g001

EEG Preprocessing

EEG recorded during fMRI was of sufficient quality to easily visualise periods of SWDs (Figure 1). Quantification of SWDs was performed by extracting EEG power between 4 and 20 Hz. On average, SWDs showed an increase of power by a factor 2.34 as compared to interictal activity, which corresponded to 2.57 times the standard deviation of interictal power. FMRI regressors were obtained by convolving such EEG power with a canonical HRF [34]. Note that this convolution smoothes and introduces a delay in the SWD time series on the order of several seconds (corresponding approximately to the time to peak of the HRF). FMRI regressors were used to construct statistical parametric maps (SPMs) of regional effects in cerebral blood volume (CBV) related to the occurrence of SWDs.

Networks Activated during SWDs

Highly significant and reproducible seizure-related activations (CBV increases) and deactivations (CBV decreases) were

found at the animal level ($p < 0.001$, Familywise Error [FWE] corrected) and at the group level ($n = 6$, $p < 0.05$, FWE corrected) (Figure 2 and Table 1). At the group level, activations were found in the barrel field of the primary somatosensory cortex (S1BF), the centromedial, mediodorsal, and ventrolateral parts of the thalamus (CM/MDL/MDC/CL/PC/VL/Po), the retrosplenial cortex (RSA/RSGb), and the reticular part of the substantia nigra (SNR). These structures are known to be involved in the generation or control of absence seizures. The cerebellum and nuclei of the pons (Mo5) and of the medulla oblongata (MdV) were also found activated. In addition, several areas were found deactivated, such as the striatum (CPu), the limb representation of the primary somatosensory cortex (S1HL/S1FL), the visual cortex (V1M/V1B/V2L), and the secondary motor cortex (M2).

Hemodynamic Response Functions

The HRF was found to last significantly longer in S1BF than in other ROIs (Figure 3A). A similar effect was observed in the

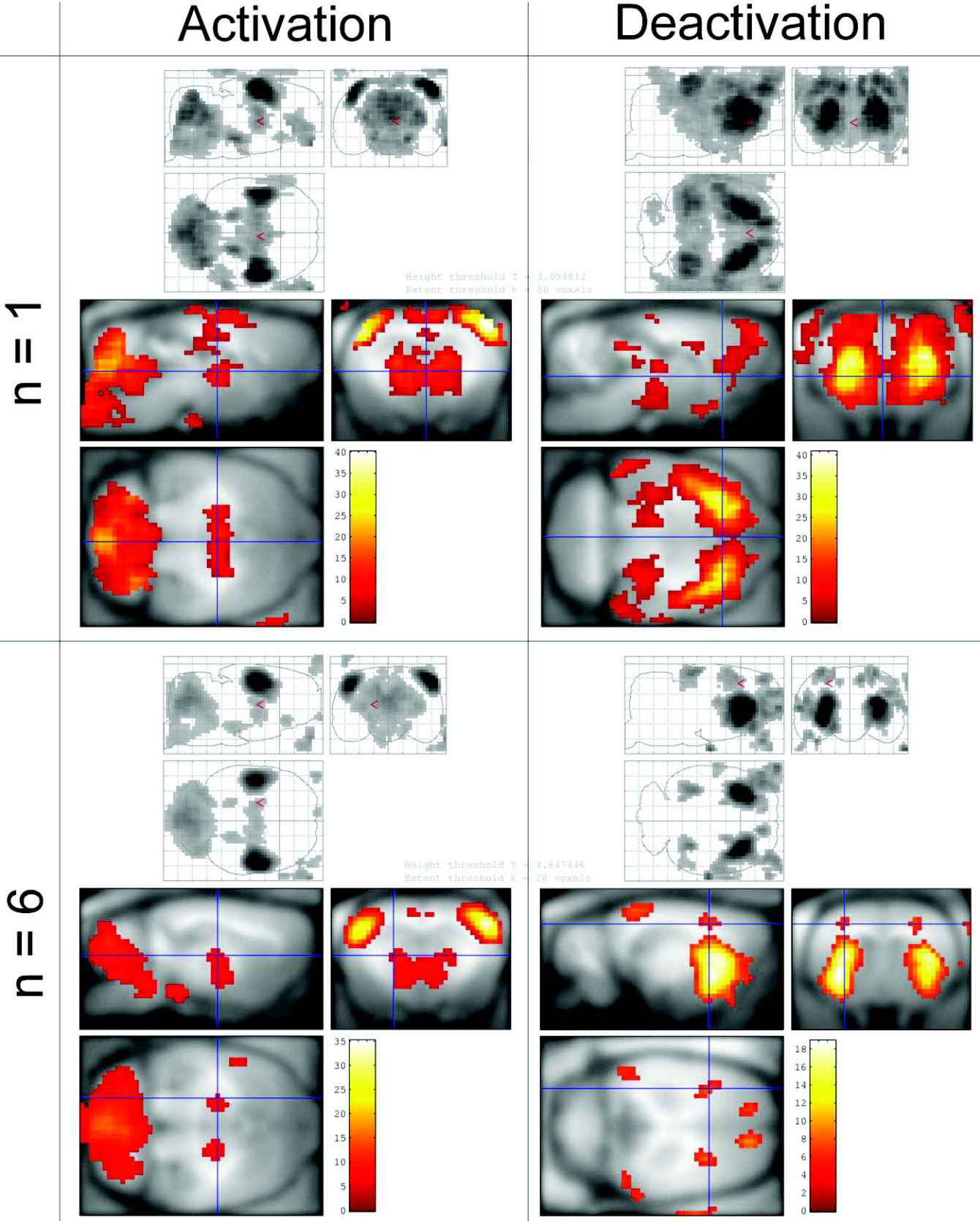


Figure 2. Maps of SWD-Related Changes in CBV
Left: activation = increase of CBV; right: deactivation = decrease of CBV. Top: typical example of activation/deactivation pattern obtained for a single animal ($n = 1$, $p < 0.001$, FWE corrected). Bottom: activation/deactivation pattern of the group of animals ($n = 6$, fixed effect analysis, $p < 0.05$, FWE corrected). Structures activated at the group level are listed in Table 1.
doi:10.1371/journal.pbio.0060315.g002

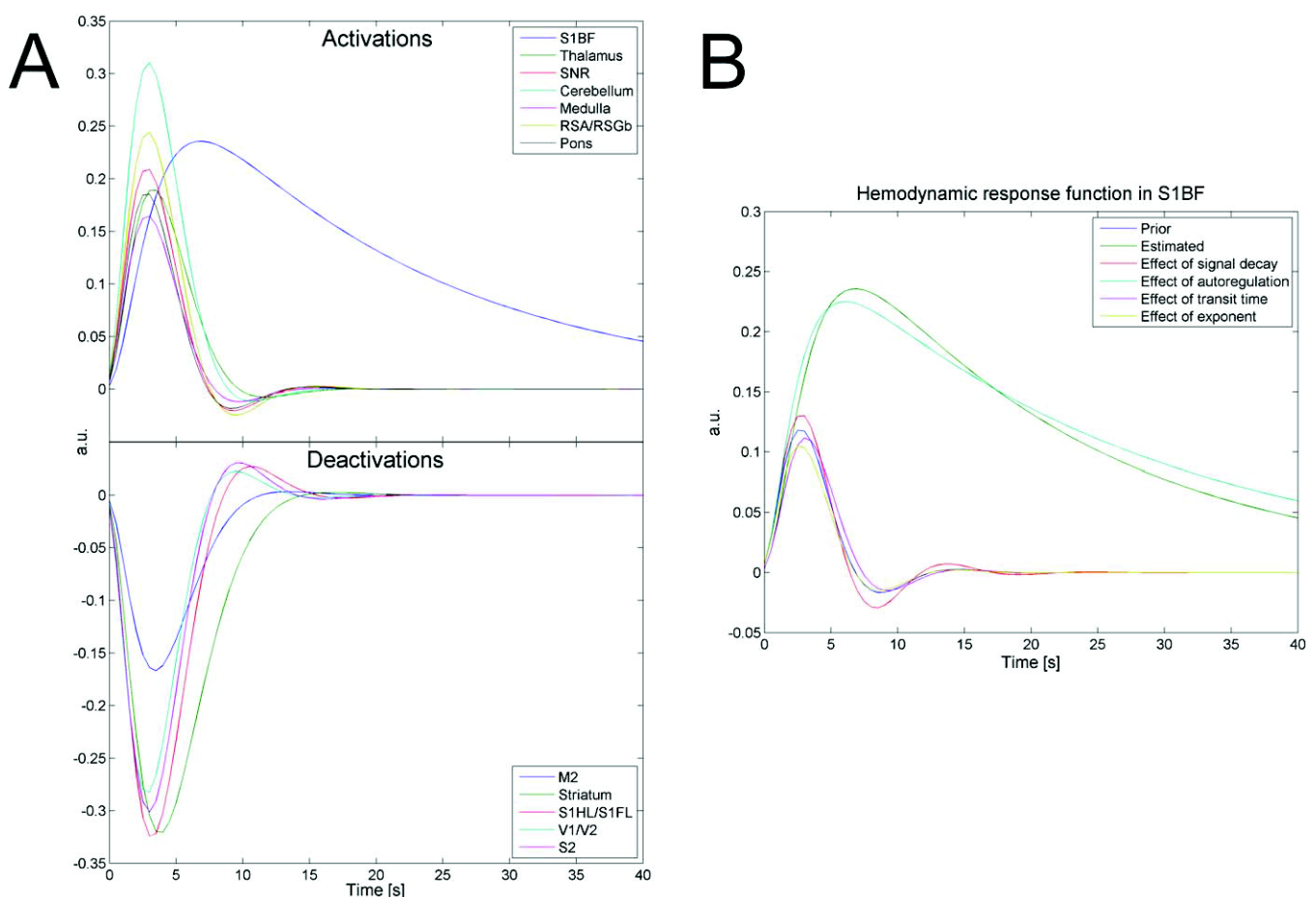
Table 1. List of Activated and Deactivated Structures during SWDs

CBV Changes	Structures	Abbreviations	Coordinates		
			D-V	M-L	A-P
Activations	Primary somatosensory cortex, barrel field	S1BF	−3.2	± 5.4	−2.6
	Thalamus, centromedial, mediodorsal and ventrolateral parts	CM/MDL/MDC/CL/PC/VL/Po	−3.2	± 0.8	−6.7
	Substantia nigra, reticular part	SNR	−6.5	± 2.3	−8.7
	Cerebellum		−12.9	0	−5.1
	Medulla oblongata (reticular formation)	MdV	−13.8	0	−9.6
	Retrosplenial cortex, barrel field	RSA/RSGb	−3.9	± 1.0	−1.4
	Pons (motor trigeminal nucleus)	Mo5	−9.7	± 2.2	−8.3
Deactivations	Secondary motor cortex	M2	2.8	± 1.5	−2.5
	Striatum	CPu	0.3	± 3.4	−6.0
	Primary somatosensory cortex, limb region	S1HL/S1FL	−1.0	± 2.8	−2.1
	Visual cortex	V1M/V1B/V2L	−7.1	± 4.0	−1.5
	Secondary somatosensory cortex	S2	−2.6	± 6.5	−5.4

See Figure 2. Coordinates indicate the centre of clusters, in the atlas of Paxinos and Watson referenced to bregma [62]. Abbreviations are those used in the atlas of Paxinos and Watson [62]. Statistical analysis: $n = 6$, fixed effect analysis, $p < 0.05$, FWE corrected.

A-P: anteroposterior; D-V: dorsoventral; M-L: mediolateral.

doi:10.1371/journal.pbio.0060315.t001

**Figure 3.** Hemodynamic Response Functions of (De)activated Structures during SWDs

(A) Hemodynamics of activated and deactivated structures during SWDs. HRFs for the different ROIs were generated using the median value (see Table 2) of parameters of a truncated hemodynamic model (see Equation 1) adjusted to the ROI time series.

(B) From prior values (in blue) of hemodynamic parameters (see Table 2), the effect of each parameter to explain the behaviour of the HRF in S1BF (in green) was evaluated by changing the parameters to their value estimated in S1BF, one at a time. The abnormally slow hemodynamics in S1BF is primarily explained by the strong decrease in the autoregulation constant of the CBF on the vasodilatation (in cyan).

doi:10.1371/journal.pbio.0060315.g003

Table 2. Hemodynamic Parameters Corresponding to the HRF Time Series Shown in Figure 3

CBV Changes	Region of Interest	Signal Decay κ	Autoregulation γ	Transit Time τ	Exponent α
Prior values		0.65	0.41	0.98	0.32
Activations	S1BF	0.52	0.03	2.24	0.28
	Thalamus	0.77 (0.0025)	0.31 (0.0002)	1.72 (0.0032)	0.33 (0.0004)
	SNR	0.72 (0.0072)	0.40 (0.0001)	1.16 (0.0001)	0.32 (0.0002)
	Cerebellum	0.86 (0.0021)	0.38 (0.0003)	1.42 (0.0005)	0.34 (0.0005)
	Medulla	0.77 (0.0019)	0.38 (0.0001)	1.21 (0.0001)	0.33 (0.0002)
	RSA/RSGb	0.69 (0.0356)	0.38 (0.0008)	1.18 (0.0008)	0.32 (0.0022)
	Pons	0.72 (0.0090)	0.41 (0.0001)	1.16 (0.0001)	0.32 (0.0003)
Deactivations	M2	0.80 (0.0124)	0.27 (0.0032)	1.91 (0.1560)	0.32 (0.0017)
	Striatum	0.75 (0.0051)	0.21 (0.0013)	2.09 (0.2627)	0.31 (0.0010)
	S1HL/S1FL	0.67 (0.2959)	0.31 (0.0004)	1.44 (0.0036)	0.31 (0.0090)
	V1/V2	0.76 (0.0043)	0.40 (0.0002)	1.10 (0.0003)	0.32 (0.0001)
	S2	0.68 (0.1169)	0.36 (0.0001)	1.28 (0.0002)	0.32 (0.0006)

Values between brackets indicate the uncorrected p -value derived from a matched-paired Wilcoxon test between S1BF and other ROIs. For more information, see Equation 1. doi:10.1371/journal.pbio.0060315.t002

striatum, to a much lesser extent. These HRFs are kernels of a hemodynamic model, the parameters of which were estimated for every fMRI session. The estimated distribution of hemodynamic parameters in S1BF was found to be significantly different from one of the other ROIs in almost all possible pairs tested (Wilcoxon test, $p < 0.01$ uncorrected; see Table 2). To determine which parameter underlies predominantly the slowness of the HRF in S1BF, we generated different HRFs using prior values of the hemodynamic parameters, with the exception of one parameter, which was set to the value estimated in S1BF (Figure 3B). This allowed us to conclude that the strong decrease of the autoregulation constant γ , instantiating a stable feedback of changes in cerebral blood flow (CBF) on vasodilatory effects (see Equation 1), is the main cause of the pathological hemodynamics observed.

These results show a large heterogeneity of HRF waveforms, in particular in S1BF and in the striatum, which has a significant impact on the estimation of connectivity. Estimation of temporal precedence, or of information transfer, and prediction between time series will be affected much by the variability in time to peak of the HRFs. Therefore, these results call for cautious interpretation of causality results directly obtained from hemodynamic measures (see Protocol S1 for a conceptual schematic).

fMRI Connectivity

Granger causality analyses. The oriented networks estimated using the linear measure of Granger causality applied to CBV-weighted signals directly and to state variables obtained after deconvolution of hemodynamics are shown in Figure 4. At the animal level, significant direction of information transfer is not detected for each connection, and a certain degree of variability is observed between animals. Results at the group level are more significant and easier to interpret. They show a clear distinction between the networks that are estimated without and after deconvolution of hemodynamics. Indeed, direct analysis of fMRI time series leads to the estimation of the striatum as being the driver of the network: significant ($p < 0.05$) driving effects were found from the striatum onto the S1BF ($F_{\text{Striatum} \rightarrow \text{S1BF}} - F_{\text{S1BF} \rightarrow \text{Striatum}} = 0.047$, $p < 0.001$) and onto the thalamus ($F_{\text{Striatum} \rightarrow \text{Thalamus}} -$

$F_{\text{Thalamus} \rightarrow \text{Striatum}} = 0.011$, $p = 0.023$). The interaction between S1BF and thalamus did not show any consistent direction of information transfer ($F_{\text{Thalamus} \rightarrow \text{S1BF}} - F_{\text{S1BF} \rightarrow \text{Thalamus}} = 0.000$, $p < 0.471$). In contrast, after deconvolution of hemodynamics, the Granger causality estimated from hidden neural states concludes that S1BF is the neural driver: $F_{\text{S1BF} \rightarrow \text{Striatum}} - F_{\text{Striatum} \rightarrow \text{S1BF}} = 0.017$, $p = 0.038$; $F_{\text{S1BF} \rightarrow \text{Thalamus}} - F_{\text{Thalamus} \rightarrow \text{S1BF}} = 0.032$, $p = 0.002$; and $F_{\text{Striatum} \rightarrow \text{Thalamus}} - F_{\text{Thalamus} \rightarrow \text{Striatum}} = 0.010$, $p = 0.046$.

To sum up, Granger causality at the group level disclosed the predicted architecture in which S1BF drove the other regions, only when applied to hidden neural states. This result clearly demonstrates the important confounding role of hemodynamic variability in functional networks estimated directly from fMRI time series.

Dynamic Causal Modelling. Connectivity estimated at the neuronal level (with a conjoint deconvolution of the hemodynamic effects) by DCM revealed the driving role of the first somatosensory cortex S1BF, as may be concluded by comparing the model evidences, at the group level, of the different classes of models tested (Figure 5B, top). This finding was remarkably consistent between animals (Figure 5B, bottom; in Rat 3, however, the most likely model indicated the striatum as the neural driver, but this finding did not survive averaging over model classes). For the most likely model (S1BF driver, model 3, see Figure 5B), Figure 5C shows neuronal and hemodynamic kernels estimated at the group level for each region. Kernels were obtained using the median value of the distribution of model parameters estimated for each session [14]. In agreement with the architecture of the model, neuronal responses of S1BF (in blue) preceded those of the striatum (in red) and of the thalamus (in green). The delay between S1BF and the other regions at half the magnitude of neuronal kernels was about 1.5 s. This value corresponds to the delay observed in intracerebral EEG between first EEG changes in S1BF and the ensuing spread of SWDs to other regions [30]. Interestingly, DCM was able to estimate HRF heterogeneity among regions interconnected at the neuronal level, indicating an effective correction of hemodynamic variability. The HRF in S1BF (in blue) was much slower (half-width = 21 s, $\kappa = 0.97$, $\gamma = 0.04$, $\tau = 2.70$, and $\alpha = 0.32$) than that of other regions (thalamus, in green: half-

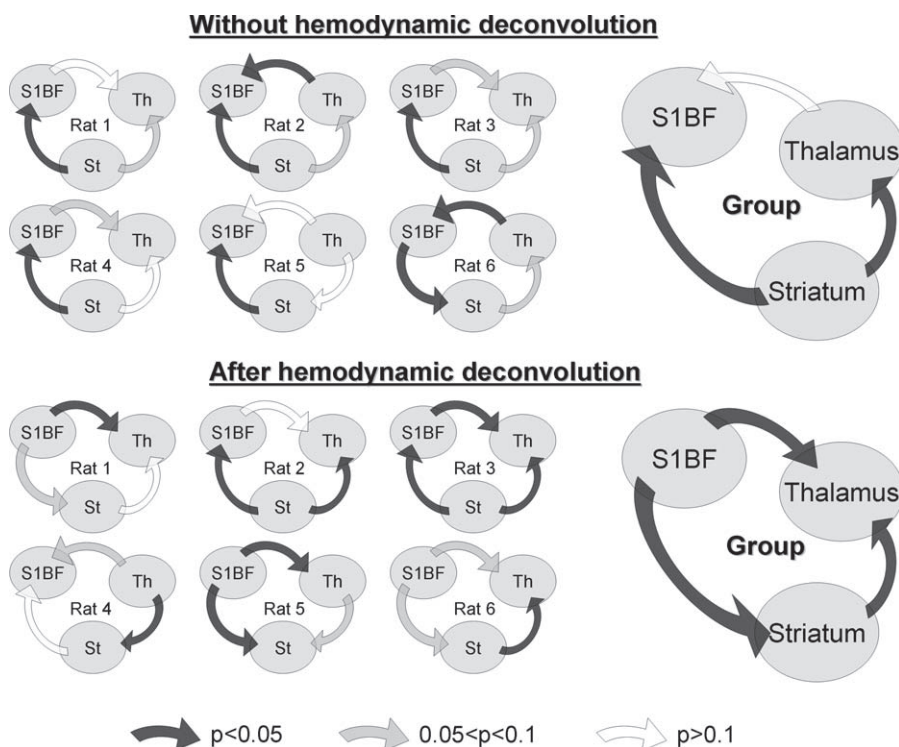


Figure 4. Functional Connectivity Estimated from Granger Causality

Oriented networks estimated using the linear measure of Granger causality for each animal (left) and for the group (right), without (top) and after (bottom) hemodynamic deconvolution. For each pair of regions (X , Y), the directionality and colour of the arrows indicate the sign and statistical significance (obtained from surrogates) of $F_{X \rightarrow Y} - F_{Y \rightarrow X}$ (see Equation 4), respectively. See main text for details. St, striatum; Th, thalamus. doi:10.1371/journal.pbio.0060315.g004

width = 7 s, $\kappa = 0.36$, $\gamma = 0.12$, $\tau = 1.75$, and $\alpha = 0.27$; and striatum, in red: half-width = 8.5 s, $\kappa = 0.50$, $\gamma = 0.09$, $\tau = 1.99$, and $\alpha = 0.29$), despite the fact that neuronal responses were the fastest in this region. Note that HRFs estimated by DCM were very similar to those estimated without taking into account neuronal connections between regions (Figure 3). Finally, Figure 5D shows extrinsic connectivity, obtained from the median value of the distribution in matrices A and C (see Equation 5) over animals and sessions, for the most plausible model (model 3, see Figure 5B). Input connectivity strength, decreasing between S1BF (1.00), striatum (0.66), and thalamus (0.33), reflects amplitude of hemodynamic signals recorded (see group t -values in Figure 2 and time series in Figure 5A and 5C).

iEEG Connectivity

Spike averaging. Analysis of the averaged spike-and-wave complex (Figure 6) indicates that the peak of the first spike in S1BF preceded by 5.5 ms and 10 ms those measured in the thalamus and the striatum, respectively. This average sequence of activation was found in all five rats except one in which the spike in thalamus was found to precede the one in S1BF by 2.2 ms. In addition, the average spike recorded in S1BF was sharper and did not show a large slow wave as is the case in the thalamus and in the striatum. These characteristics indicate a specific electrical signature in S1BF, potentially related to its role as neural driver.

Generalised synchronisation. The oriented network estimated by a measure of generalised synchronisation between iEEG signals was obtained by averaging, for each pair of

regions (X , Y), the interaction measure $\Delta(Y | X) - \Delta(X | Y)$ (see Protocol S2) over seizures and animals between 2 and 8 s after seizure onset (Figure 7). Significant driving effects were found from S1BF onto the striatum ($p < 10^{-9}$, Wilcoxon test uncorrected for multiple comparisons) and onto the thalamus ($p < 0.002$). The interaction between striatum and thalamus did not show any consistent direction of information transfer ($p > 0.39$). Connectivity analysis of iEEG signals thus confirmed the role of S1BF as neural driver for thalamic and striatal activity.

Discussion

In this study, we used a well-recognised animal model of absence epilepsy (GAERS) [27,28] to assess whether fMRI can be used to determine directionality of interactions between remote brain regions. In epilepsy research, estimating neuronal drivers (i.e., epileptogenic zone) within epileptic networks is one of the major issues. In drug-resistant patients with focal epilepsy, for instance, the precise determination of neuronal drivers should have a major surgical impact [35]. This is also true in cognitive neuroscience, in which the possibility to estimate oriented interregional connectivity should permit the refinement of network theories of brain function [3].

Although it is well established that SWDs in absence epilepsy result from paroxysmal oscillations within cortico-thalamic networks, the respective contributions of the neo-cortex and of the thalamic relay nuclei in the initiation of such activity are still debated [31,36]. It was first suggested that SWDs originate from a subcortical pacemaker with

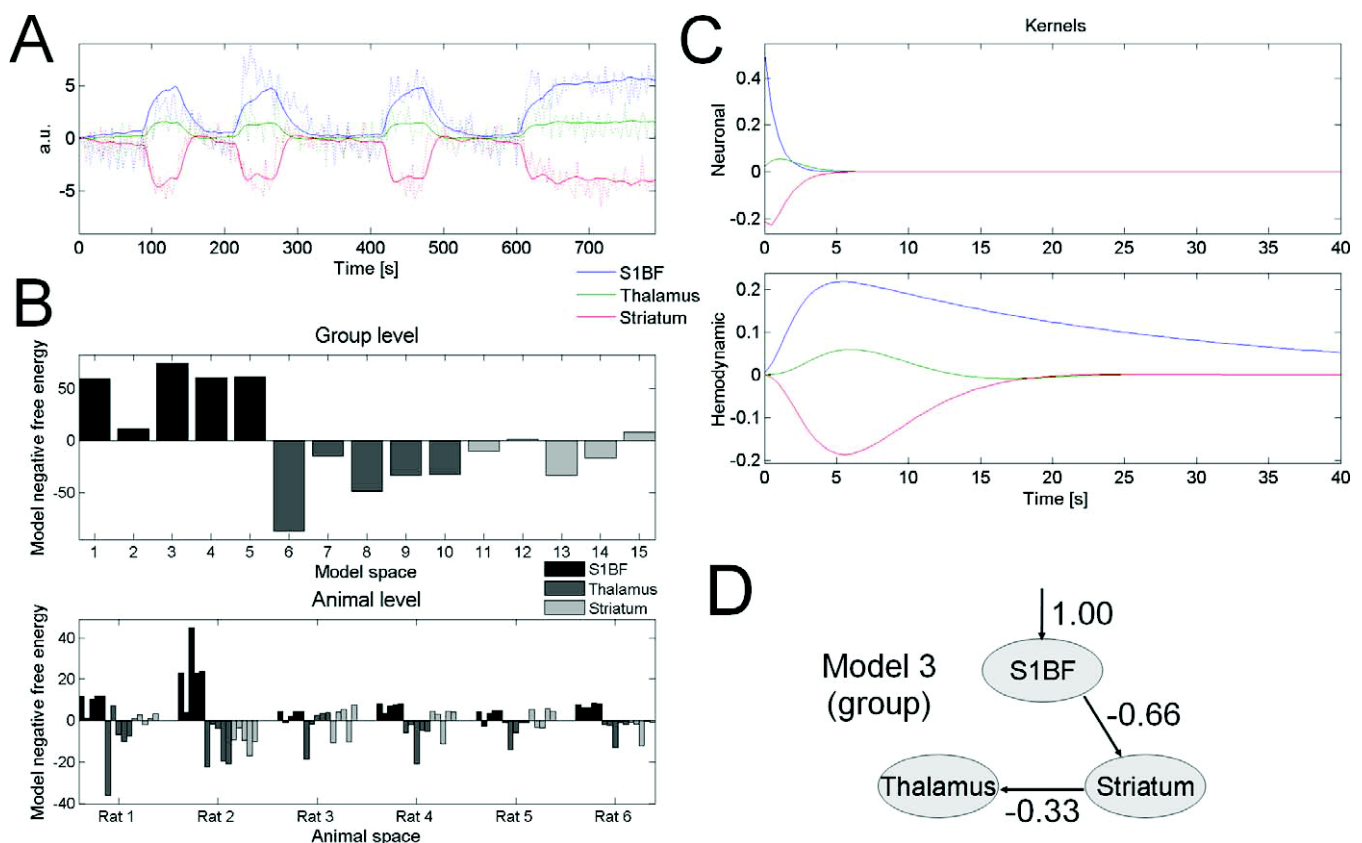


Figure 5. Dynamic Causal Modelling

(A) Example showing how DCM (model 1) fitted measured data from a session containing four seizures.

(B) Model comparison using the negative free energy (for clarity, the average over the models of the negative energy has been removed). Top: at the group level, the models 1–5 assuming S1BF as being a driver are the most plausible (model 3 is the most plausible at the group level, mainly because of the high value of its evidence in rat 2). Bottom: this result at the group level was found in all rats when pooling over each class. However, in rats 3 and 5, a model assuming the striatum as a driver was found the most plausible (in rat 5, this finding was not significant, i.e., difference of negative energy with a model assuming S1BF as being a driver was lower than three).

(C) Neuronal and hemodynamic kernels at the group level obtained from median value of model parameters estimated at the individual level for the most plausible model (model 3, see [B]).

(D) Extrinsic connectivity, obtained after averaging matrices A and C over the animals, for the most plausible model (model 3, see [B]).

doi:10.1371/journal.pbio.0060315.g005

widespread and diffuse cortical projections [37–41] or from an interaction between cortical and thalamic neurons. However, data from a pharmacological model of SWDs in the cat [42–44] and from a genetic model of absence epilepsy, the Wistar Albino Glaxo/Rijswijk (WAG/Rij) rat [31,32,45], provided evidence for a leading role of the cerebral cortex. In

the GAERS, it was found that SWDs are initiated in the facial region of the somatosensory cortex before propagating, or not (for brief SWDs), to the ventrolateral thalamus and to the primary motor cortex [30]. In addition, inhibition of this part of the first somatosensory cortex by local application of tetrodotoxin was shown recently to suppress SWDs (P. O. Pollack, S. Mahon, M. Chavez, and S. Charpier, unpublished data). In human patients with absence epilepsy, fMRI [46] and positron emission tomography (PET) [47] studies showed the involvement of the thalamocortical system during SWDs, but without any clear evidence for the site of initiation of such activity.

Here, using concurrent fMRI and EEG measurements, we obtained SWD-correlated changes in CBV beyond the thalamus and S1. Significant activations or deactivations were also found in the brainstem, cerebellum, SNR, striatum, and different cortices (retrosplenial, visual, limb region of S1, and motor and sensory secondary). Interestingly, all these structures were activated bilaterally, resulting in a symmetrical network. Whereas, to our knowledge, the role of the cerebellum in the generation or control of SWDs has hitherto not been addressed, the spreading of discharges to different

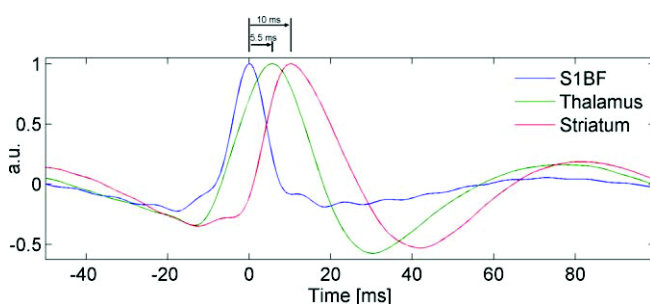


Figure 6. Spike and Wave Complex Averaged over Seizures and Rats

The spike observed in S1BF precedes by 5.5 ms and by 10 ms (time to peak) those measured in the thalamus and in the striatum, respectively. doi:10.1371/journal.pbio.0060315.g006

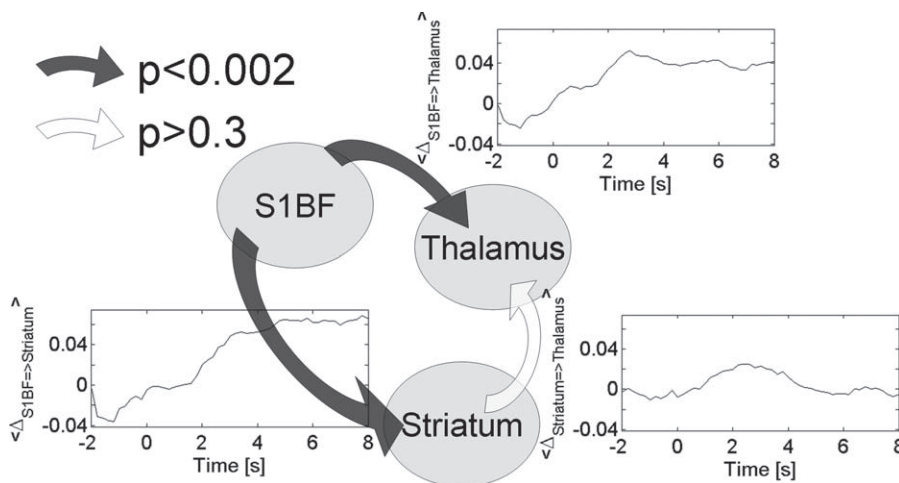


Figure 7. Direction of Information Transfer Estimated in iEEG from the Measure of Generalised Synchronisation

A significant and stable, among the first seconds of SWDs, driving effect was found from S1BF towards thalamus and striatum. No consistent directionality was found for the connection between striatum and thalamus.

doi:10.1371/journal.pbio.0060315.g007

cortices was described [48]. CBV changes in striatum and substantia nigra pars reticulata are particularly noteworthy, as these structures, respectively the input and output of the basal ganglia, were suggested to control epileptic seizures in different animal models [49]. For instance, activation of dopaminergic transmission in the striatum suppresses seizures, whereas its inhibition by dopaminergic antagonists aggravates SWDs [50]. Similarly, inhibition of the substantia nigra pars reticulata by pharmacological manipulation is well known to block epileptic seizures in different models, including the GAERS [51]. Our EEG/fMRI results are thus in line with the view that SWDs propagate to different cortical regions, and to subcortical regions as well. Activation of basal ganglia circuits would allow endogenous regulation of SWDs, which can be artificially enhanced by neuromodulation techniques [49].

Two EEG/fMRI studies were performed in the WAG/Rij rat [52,53]. Bilateral activations were also found in the frontoparietal cortex, the thalamus, and brainstem nuclei. No deactivations were reported, however. GAERS and WAG/Rij rats, though similar in many aspects, show also some differences, in particular in the features of spontaneous SWDs [28]. These differences may explain why fMRI activations only partly overlap. Importantly, a strong activation in S1BF is observed in both models. This finding supports the important role of this part of the cortex in the initiation of SWDs, as demonstrated by electrophysiology in GAERS and in WAG/Rij rats [30–32].

In the present study, in addition to revealing the spatial organisation of the epileptic network, we estimated the HRF to SWDs in the different regions involved. We thereby used a truncated hemodynamic model [20] characterised by various parameters directly related to underlying biophysical processes. In the model used, it is assumed that changes in synaptic activity trigger vasodilatory effects described by the lumped time constant called “signal decay κ .” Vasodilation induces changes in cerebral blood flow (CBF), which in return have an autoregulation effect on changes in vasodilation (constant γ in the model). Changes in CBV are then obtained from changes in CBF using a state equation

with two parameters (a transit time τ and an exponent α for nonlinear effects). Our main finding here was an abnormally slow HRF in S1BF, due to near suppression of the autoregulation mechanisms of CBF on vasodilatation. The autoregulation constant γ is a lumped parameter that summarises, in dynamical terms, the effects of many different physiological processes involved in the feedback autoregulatory mechanisms occurring during functional hyperemia. Functional hyperemia, which matches the delivery of blood flow to the activity level of each brain region, requires coordinated cellular events that involve neurons, astrocytes, and vascular cells [54]. Deregulation of the function of any of these cell types in S1BF thus appears as a plausible physiological mechanism to explain the abnormally long time constant of CBF feedback that we found. Additional experiments in the future are needed to reveal which processes involved in regulation of vasodilatation by blood flow are exactly altered in the first somatosensory cortex of the GAERS.

Such differences in hemodynamic properties allowed us to challenge the face validity of functional connectivity analyses in fMRI. For simplicity and reproducibility among animals of this validation study of functional connectivity in fMRI, we selected three regions of interest that (1) were the most consistently activated over sessions and animals, (2) exhibited different hemodynamics, and (3) were easily integrated in our current understanding of SWDs. We selected first S1BF because of recent evidence indicating its role as a cortical driver, second the ventrobasal thalamus because it is known that the thalamocortical loop is implicated in SWDs, and third the striatum because of various studies suggesting its role in the control of SWDs. Other structures also showing significant CBV changes at the group level were ignored, either because the signal-to-noise ratio was too low at the session level (because estimated connectivity is related to effect size and highly depends on signal-to-noise ratio, this would have entailed a significant loss of results reproducibility between animals and sessions), or because no experimental evidence was available for validating connectivity results (for instance, it would have been difficult to interpret

fMRI connectivity results for cerebellum that has never been explored in GAERS).

The Granger causality measure tested [25,33], heavily based on the concepts of temporal precedence, information transfer, and prediction between time series, estimated the striatum as being the neural driver of SWDs when applied directly to fMRI signals. This result strongly contradicts the evidence from the literature [49]. We then evaluated whether the very same Granger causality measure, but applied to hidden neural states estimated after deconvolution of hemodynamic effects in fMRI time series, would be more compelling. It was indeed the case since S1BF was identified as the neural driver at the group level. Comparison of the results of both analyses demonstrates that the failure of connectivity analysis from original fMRI time series to identify S1BF as the neural driver is due to regional variability of the HRFs. Finally, connectivity analyses at the neuronal level using DCM were also able to reconstruct a meaningful connectivity pattern. Bayesian model comparison showed a clear preference for the models specifying S1BF as the neuronal driver, with consistent reproducibility among animals. At the animal level, results obtained with DCM were more reproducible than with the linear implementation of Granger causality. It is probable that more sophisticated approaches, including multivariate, nonlinear, parametric, or nonparametric implementation of Granger causality [55–57], would have allowed a significant improvement in result reproducibility between animals.

fMRI connectivity analyses were validated using iEEG data obtained in freely moving rats. The directionality of interactions, estimated from the asymmetry of a measure of generalised synchronisation, clearly indicated S1BF as being the driver. The generalised synchronisation measure relies on time-embedding of iEEG signals (Takens' theorem). This manipulation depends upon some parameters that are sometimes difficult to optimise [58], and moreover, its theoretical underpinnings [59] might not be totally fulfilled by brain signals. In view of these potential difficulties, for construct validation in terms of spike propagation, the averaged SWD complex was computed, and a temporal precedence of the activity in S1BF was demonstrated, as anticipated from iEEG generalised synchronisation and from fMRI connectivity.

Because fMRI does not provide sufficient information to reconstruct accurate electrical activity, the neuronal model used in DCM remains necessarily simple, allowing the generation of caricatures of neural states. Nevertheless, DCM distinguished different functional hypotheses in a meaningful way. To our knowledge, this study provides the first experimental validation of DCM for fMRI using invasive EEG recordings. The so-called “synaptic activity” estimated by DCM remains difficult to interpret. First-order electrical kernels (see Figure 5) do not allow the generation of EEG-like signals if convoluted with a random input (as classically done when modelling EEG with neural mass models [60]) because their time constant (~ 2 s) is too large to generate the 7–9-Hz oscillations that characterise SWDs in GAERS. Their dynamic properties are more compatible with the rate of change of EEG power often observed at the beginning of seizures (see Figure 1 in [30]). The coupling parameters of DCM might then be interpreted as indications of how changes in EEG power are transferred between regions. Because DCM

parameters in fMRI are estimated from several minutes of recordings, the significant difference that was found between models implies that the information transfer is more or less stable during seizures—in other words, that one direction of information transfer dominates. This is indeed what we observed in iEEG, as far as connectivity from S1BF was concerned (Figure 7). Finally, it is important to note that, like any model-based approach, results depend on the assumptions of the generative model used. In particular, current implementation of DCM [14] does not take into account time lags between neural populations due to conduction velocities and propagation through dendritic trees. Elaborating and validating a more realistic neural model for DCM in fMRI taking time dependencies into consideration would be interesting, but goes well beyond the scope of this work.

This study is, to our knowledge, the first electrophysiological validation of fMRI connectivity analyses based on Granger causality and Dynamic Causal Modelling using a well-characterised animal model of functional coupling. As such, it has important implications for such studies that are starting to predominate in the functional neuroimaging literature on connectivity. Our results clearly indicate that one must minimise spurious interactions due to hemodynamic variability between brain regions using explicit or implicit (such as in DCM) deconvolution of hemodynamic effects in fMRI time series. Otherwise, directed functional connectivity results should be taken cautiously, particularly if one cannot demonstrate that hemodynamic properties are the same in every region analysed.

Materials and Methods

Animal preparation and data acquisition. Experimental procedures and animal care were carried out in accordance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). They were approved by the Ethical Committee in charge of animal experimentation at the Université Joseph Fourier, Grenoble (protocol number 88–06). Six male adult GAERS (281 ± 56 g) were used for the fMRI/EEG study, and five adult GAERS (two males, three females; 232 ± 70 g) were recorded in iEEG.

fMRI/EEG experiments. Spontaneous seizures were measured during magnetic resonance (MR) experiments using EEG. Animals were equipped with three carbon electrodes located on the skull near the midline (frontal, parietal, and occipital), several hours prior to the MR experiments. Two additional carbon electrodes were used to monitor cardiac activity (electrocardiography [ECG]). Because absence epilepsy is suppressed by anaesthesia, animals were maintained conscious under neuroleptanalgesia.

Anaesthesia was induced under 5% isoflurane, maintained under 2% isoflurane during animal preparation, and stopped during MR acquisition. The femoral artery was catheterised to allow administration of an iron-based superparamagnetic contrast agent (injected as a bolus just before MR preparatory settings, 8 mg Fe/kg, i.e., 145 mmol Fe/kg, Sinerem) and infusion of curare and analgesics. Just before inducing neuroleptanalgesia, a tracheotomy was performed, and animals were ventilated at 90 breaths/min throughout the rest of the experiment. Neuroleptanalgesia was induced using an intravenous bolus of d-tubocurarine (1 ml/kg). Animals were then maintained under intravenous infusion of a mixture of d-tubocurarine (1.2 mg/kg/h), Fentanyl (3 μ g/kg/h), and haloperidol (150 μ g/kg/h) [30].

Animals were secured in an MR-compatible, customised, stereotaxic headset with ear and tooth bars. They were positioned in the magnet, maintained in position between 3 and 4 h for data acquisition, and then sacrificed. Rectal temperature was monitored and kept at 37 °C using a heating pad positioned under the animal.

MR imaging was performed in a horizontal-bore 2.35 T magnet (Bruker Spectrospin), equipped with actively shielded magnetic field gradient coils (Magnex Scientific) and interfaced to a SMIS console (SMIS). A linear volume coil was used for excitation (internal

diameter 79 mm), and a surface coil was used for detection (Rapid Biomedical). Both coils were actively decoupled.

T_1 -weighted anatomical images were acquired using a 3D-MDEFT sequence with parameters optimised following the procedure described in [61]: voxel size = $0.333 \times 0.333 \times 0.333$ mm³, TI = 605 ms, $\text{quot} = 0.45$, $\alpha = 22^\circ$, TR/TE = 15/5 ms, and BW = 20 kHz. CBV-weighted measurements were made with gradient-echo echo-planar imaging (EPI) acquisition (two shots, data matrix = 48×48 , FOV = 35×35 mm², 15 contiguous 1.5-mm-thick slices covering the whole brain, $\alpha = 90^\circ$, TE = 20 ms, TR = 3 s). Functional volumes were acquired over about 2 h, in several 30-min sessions to prevent overheating of the gradient hardware. 3D-MDEFT and EPI images were centred to facilitate superimposition.

EEG and ECG signals were sampled simultaneously with fMRI at 1,024 Hz (SD32, Micromed). ECG was merely used to monitor the physiological state of animals. When ECG revealed a heart frequency below 250 beats/min, the experiment was terminated, and the animal was sacrificed. EEG and fMRI temporal coregistration was ensured by the EEG acquisition software recording a TTL signal from the MR system at each volume acquisition.

iEEG experiments. For the iEEG recordings, GAERS were implanted with intracerebral electrodes under general anaesthesia (diazepam 4 mg/kg intraperitoneally [i.p.], ketamine 100 mg/kg i.p.). Pairs of electrodes formed of stainless steel wires (0.175 mm) separated by 2 mm on the longitudinal axis were stereotactically placed in each structure targeted. Stereotactic coordinates were as follows, with the bregma as reference [62]: (1) first somatosensory cortex S1BF (anteroposterior [AP]: −1 and −3 mm; mediolateral [ML]: +5 mm; and dorsoventral [DV]: −3 mm), (2) ventrobasal thalamus (AP: −2.3 and −4.2 mm; ML: +2.4 mm; and DV: −6.2 mm), and (3) striatum (AP: +3 and −0.8 mm; ML: +3 mm; and DV: −6 mm). Two additional electrodes (stainless steel screws) were fixed in the nasal and occipital bones to serve as reference and/or ground. All electrodes were connected to a female microconnector that was fixed to the skull by acrylic cement. Animals were allowed to recover for a week, during which they were handled daily for habituation. Once implanted, the rats were kept alive 2 mo at maximum. They were killed by an overdose of pentobarbital, and their brains were then removed and cut into 20- μ m coronal sections. These sections were stained with cresyl violet, and each site was localised with reference to the atlas of Paxinos and Watson [62,63]. Electrode implantation was considered correct if the centre of gravity of the pair of electrodes was located within the targeted structure.

Electroencephalograms were recorded in awake, freely moving animals, using a digital acquisition system (Cambridge Electronic Design) with a sampling rate of 2 kHz and analog filters (high-pass filter 1 Hz/low-pass filter 90 Hz). During the recording sessions, rats were continuously watched to detect abnormal posture or behaviour. Sessions did not exceed 2 h and were performed between 9:00 AM and 5:00 PM.

fMRI/EEG data analysis. fMRI data analysis was done using SPM5 (Statistical Parametric Mapping, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, Functional Imaging Laboratory, London, UK). Some routines of this software were adapted to rat imaging in accordance with [63].

Spatial preprocessing. For each session, EPI volumes were first realigned to account for motion correction. All images were then normalised to a 3D-MDEFT template with coordinates chosen according to the rat atlas of Paxinos and Watson, with the origin at the bregma [62]. Normalised images were resampled to reach an isotropic spatial resolution of 0.4 mm. Finally, normalised EPI images were smoothed with a Gaussian kernel of 0.5-mm width. Statistical analysis was done on smoothed, normalised, and realigned EPI images.

Statistical maps of SWD-related regional CBV changes. Statistical maps of regional CBV changes in relation to SWDs were obtained using the standard procedure applied in EEG/fMRI studies of epilepsy [64,65]. It consists of the detection of epileptic events in the EEG. A regressor of interest for fMRI data is then obtained by convolving EEG epileptic events with a model of the hemodynamic impulse response function [66]. If the impulse response is causal (which is usually the case), it is assumed that electrical activity precedes and causes hemodynamic changes.

SWDs were extracted from the EEG using a moving average (time window length = 2 s; sampling rate = 5 Hz) of EEG power between 4 Hz and 20 Hz. SWD power was then scaled such as to be about zero between SWDs and about one during SWDs. Note that it was not necessary to correct imaging or cardiac artefacts in our data because they were not significant at frequencies of SWDs. The SWD regressor

used for fMRI statistical analysis was obtained by convolving the normalised SWD power with the canonical HRF provided in SPM5.

For each animal, SPMs of the t -statistic of SWD-related activations were obtained by correlating the high-pass filtered (cutoff = 0.97 mHz) time series of each voxel with the SWD regressor using a standard first-level multisession statistical design [67]. Activations at the group level were obtained using a fixed-effect analysis following guidelines provided in [68]. The decision to perform a fixed-effect analysis was based on (1) the reduced number of animals ($n = 6$) being too small to perform a random-effect analysis and (2) the excellent reproducibility between animals of the activation patterns.

Estimation of hemodynamic parameters in regions activated during SWDs. Activation maps were obtained under the conventional hypothesis of identical hemodynamics all over the brain. Although this assumption is particularly convenient to obtain statistical maps, significant hemodynamic variability is to be expected [69–71]. Taking into account this spatial variability is critical in identifying neuronal drivers from fMRI signals. We therefore estimated the HRFs in the different structures activated.

A biophysical model of brain hemodynamics was used to biologically constrain the estimation of the HRFs. We therefore adapted the hemodynamic model used in [14,20] to the measurement of CBV-weighted signals (due to the use of an iron contrast agent). Briefly, we removed from the distributed version of DCM (SPM5, <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>) the state equation corresponding to the definition of deoxyhemoglobin content, and we changed the output equation that was developed for BOLD signals (assuming BOLD signals as arising from a mixture of CBV and blood oxygenation effects). The model thus described below is a truncated version of the hemodynamic model developed in [20]. For the i th region, neuronal activity z_i causes an increase in a vasodilatory signal s_i (time constant κ_i) that is subject to autoregulatory feedback (autoregulation constant γ_i). Inflow f_i responds in proportion to this signal with changes in blood volume v_i (time constant τ_i and nonlinear constant α_i):

$$\begin{cases} \dot{s}_i = z_i - \kappa_i s_i - \gamma_i (f_i - 1) \\ \dot{f}_i = s_i \\ \tau_i \dot{v}_i = f_i - v_i^{1/\alpha_i} \\ y_i \propto v_i \end{cases} \quad (1)$$

Variations in CBV-weighted signals y were assumed to be proportional and of opposite sign to variations of blood volume v —a CBV increase shortens the transverse relaxation time [72]. The four hemodynamic parameters for each region i (κ_i , γ_i , τ_i , and α_i) were estimated from the time series of each ROI using a maximisation-expectation algorithm [73], similar to the one used in the standard DCM procedure [14].

Deconvolution of hemodynamics. Most methods to infer the direction of information transfer between two time series are based on identifying temporal precedence. If past activity of a given region X helps predicting current activity of another region Y , then it is assumed that the activity of X causes to some extent the activity of Y . Although compelling, temporal precedence in fMRI time series may be biased by regional variability of hemodynamics (see Protocol S1 for an intuitive explanation). Consequences of hemodynamic variability can be minimised by deconvolving fMRI time series with a hemodynamic impulse response function. Output time series represent then hidden state variables that are more closely related to neuronal activity. Instead of original fMRI time series, such a state-space model can be used to infer functional connectivity.

Hemodynamic deconvolution of each ROI time series was performed as described in [34]. Under linear assumption, fMRI signals $m(t)$ can be modelled as the result of the convolution of neural states $s(t)$ with a hemodynamic response function $h(t)$:

$$m(t) = s(t) \otimes h(t) + \varepsilon(t) \quad (2)$$

where t is the time and \otimes denotes convolution. $\varepsilon(t)$ is the noise in the measurement, assumed here to be white and therefore defined by its constant power spectrum $|\mathcal{E}(\omega)|^2 = \varepsilon_0^2$. The estimation $\hat{s}(t)$ of the neural states $s(t)$ was obtained using the following formula [34]:

$$\hat{s}(t) = FT^{-1} \left\{ \frac{H^*(\omega)M(\omega)}{|H(\omega)|^2 + \varepsilon_0^2} \right\} \quad (3)$$

where FT^{-1} denotes the inverse Fourier transform, and $H(\varepsilon)$, $M(\varepsilon)$ are the Fourier transform of $h(t)$, $m(t)$, respectively. For each ROI, the hemodynamic response function $h(t)$ was obtained after optimising the parameters of the biophysical model described in Equation 1. The expectation-maximisation algorithm used for this parameter optimisation also provided the value of the noise power spectrum ε_0^2 .

Granger causality analysis. Granger causality measures have been proposed recently to identify the direction of information transfer between remote brain regions recorded in fMRI [25,33]. In its simplest version, Granger causality is computed using linear multivariate autoregressive models of fMRI time series. For each pair of brain regions X and Y , the linear influence from X to Y ($F_{x \rightarrow y}$) and from Y to X ($F_{y \rightarrow x}$) is defined as follows [25]:

$$\begin{cases} x[n] = -\sum_{i=1}^p A_x[i]x[n-i] + u[n] \\ y[n] = -\sum_{i=1}^p A_y[i]y[n-i] + v[n] \\ q[n] = \begin{bmatrix} x[n] \\ y[n] \end{bmatrix} = -\sum_{i=1}^p A_q[i]q[n-i] + w[n] \end{cases}$$

$$\begin{cases} \text{var}(u[n]) = \Sigma_1 \\ \text{var}(v[n]) = T_1 \\ \text{var}(w[n]) = \begin{bmatrix} \Sigma_2 & C \\ C & T_2 \end{bmatrix} \end{cases}$$

$$\begin{cases} F_{x \rightarrow y} = \ln \left(\frac{|T_1|}{|T_2|} \right) \\ F_{y \rightarrow x} = \ln \left(\frac{|\Sigma_1|}{|\Sigma_2|} \right) \end{cases} \quad (4)$$

where x and y are the time series of regions X and Y . In Results, they correspond either to hemodynamic activity (fMRI signals entered directly into the analysis) or to hidden neural states (obtained from fMRI signals using Equation 3). $x[n]$ corresponds to the n th time bin of x . The three first lines of Equation 2 define autoregressive models for time series of regions X and Y , the three lines below quantify the residual variances, i.e., how well autoregressive models predict time series, and the two last lines show how interdependency measures are defined from the residual variances. Autoregressive models were estimated using the Matlab package ARfit (<http://www.gps.caltech.edu/~tapio/arfit/>) [74,75]. The model order p was defined according to the Schwarz Bayesian criterion [76]. It measures the efficiency of the parameterised model in terms of predicting the data and penalises the complexity of the model, where complexity refers to the number of model parameters.

For each pair of regions (x , y), statistics on the asymmetry of the interaction measure $F_{x \rightarrow y} - F_{y \rightarrow x}$ were obtained using 999 surrogate datasets [77] that were constructed for each session by translating, independent of each another, ROI time series by a random number of time samples. Surrogates thus destroyed local time interdependencies and preserved the properties of each signal taken separately. They allowed one to estimate distributions of Granger causality under the null hypothesis that ROI time series were locally uncorrelated and were not time-locked over sessions and animals. Null distributions were drawn at the animal and group levels by averaging $F_{x \rightarrow y} - F_{y \rightarrow x}$ over sessions and animals for each surrogate realisation. p -Values on the direction of interactions were obtained by comparing the value computed from original data to the null distribution constructed from surrogates (see [77] for a review on surrogates).

We refer here to the simplest implementation of Granger causality because it is the most popular in fMRI [25,33]. However, there are many other possibilities, including parametric and nonparametric nonlinear approaches that have been applied to the brain, mainly in electrophysiology [55–57].

Dynamic Causal Modelling. DCM [14] relies on a biophysical model that connects the neuronal states z , called “synaptic activity,” to fMRI signals. A bilinear neuronal state equation specifies the connectivity between n brain regions:

$$\dot{z} = \left(A + \sum_j u_j B^j \right) z + Cu \quad (5)$$

where A , B , and C are connectivity matrices, and u are inputs to the neural system. The synaptic activity is then transformed into fMRI signals using the hemodynamic model described in Equation 1. Using a maximisation-expectation algorithm, DCM proceeds to a conjoint estimation, from the measured CBV time series, of the neuronal parameters (connectivity matrices A , B , and C) and of the four hemodynamic parameters for each region i (κ_i , γ_i , τ_i , and α_i). In other words, it performs in one step the hemodynamic deconvolution and

connectivity estimation between hidden neural variables. This implies a certain degree of interactions between both processes that potentially results in more robust results than when deconvolution and connectivity analyses are taken separately.

For the present study, we identified neural drivers within a small network composed of three regions. To prevent introducing any bias in the estimation of functional connectivity, we did not take into account prior anatomical information about probable missing connections. We thus chose to specify all possible unidirectional networks comprising direct and/or indirect connections (15 models; S1BF driver: models 1–5; thalamus driver: models 6–10; striatum driver: models 11–15) (Figure 8). Because DCM necessitates knowledge of the inputs u , we defined u as being equal to the SWD regressor—shifted backwards in time (400 ms, which corresponds approximately to the time constant of the driver’s DCM neuronal kernel, see results in Figure 5) to account for neuronal filtering (u is a presynaptic input whereas the EEG reflects multi-postsynaptic activity [60]). In each model, an input u (non-zero C matrix) was applied to the assumed neural driver. Here, input u must be thought of as a practical way to model unstable dynamics intrinsically generated by an epileptic focus, using simple dissipative neural models used by DCM as described in Equation 5. In the models shown in Figure 8, the region receiving input u transfers the information to other regions with forward connections (matrix A). For parsimony, we did not allow a modulation of the interregional connection strength by u (by the means of the modulatory matrix B). We thereby assumed that the connection strength did not vary between ictal and interictal states. To conform to standard practice in DCM studies, only self modulation (first diagonal of B) of the region receiving the exogenous input was allowed. Actually, because it appears that inputs u were very close to zero during interictal states, assumptions about connectivity modulation had little effect on the parameters estimated.

Identification of the neural driver in the 15 competing models (Figure 8) was done using Bayesian model comparison based on model evidence [78]. Practically, the model log-evidence was approximated by the model negative free energy, the criterion used for optimising the model parameters [14], which is a tight lower bound on the log-evidence. The most plausible model is the one with the largest negative free energy, i.e., the best fit to the data. A difference in log-evidence of approximately three is usually taken as strong evidence for one model over the other (i.e., the marginal likelihood of one model is ~ 20 times the other) [14]. Assuming each dataset is independent of the others, the log-evidence at the group level (or at the animal level when different sessions have been acquired) is simply obtained by adding the log-evidence of each session [79].

iEEG data analysis. iEEG data analysis was done using a SPM5 Toolbox for intracerebral EEG developed in our laboratory. iEEG signals were first band-pass filtered between 5 and 100 Hz to capture the main frequencies of SWDs and to remove motion artefacts in low EEG frequencies. Seizures were visually detected. Only those showing (1) no movement artefact, (2) preictal and postictal periods of at least 4 s, and (3) a duration of at least 10 s were kept for further analysis ($n = 72$).

As a first estimation of the sequence of “activation” within the three implanted structures, spike averaging over time was performed. An ad hoc algorithm, based on EEG amplitude thresholding and local maxima identification, was implemented in which the first peak of the SWD complex was detected in signals originating from S1BF. The mean activation pattern was then obtained by averaging each SWD complex over time, seizures and animals using a time window covering from 50 ms before up to 80 ms after detected spikes. The delay between the peaks in the signals from the different structures was finally measured on the averaged waveforms.

Further functional connectivity analyses in iEEG were performed using a nonlinear measure based on the concept of generalised synchronisation [13,16,80,81]. By definition, generalised synchronisation exists between two dynamical systems X and Y when the state of the response system Y is a function of the state of the driving system X : $Y = F(X)$. If F is continuous, two close points on the attractor of X should correspond to two close points on the attractor of Y . An important feature of generalised synchronisation is that synchronised time series can look very dissimilar, which is critical for analysing highly nonlinear signals such as those measured with EEG in epilepsy.

Details of these methods can be found in Protocol S2. Briefly here, we used the normalised measure of generalised synchrony Δ between regions X and Y as described elsewhere [13,16]. There are two ways to compute Δ , which we denote $\Delta(X|Y)$ and $\Delta(Y|X)$. $\Delta(X|Y)$ and $\Delta(Y|X)$ are not identical for asymmetric systems. This property can be

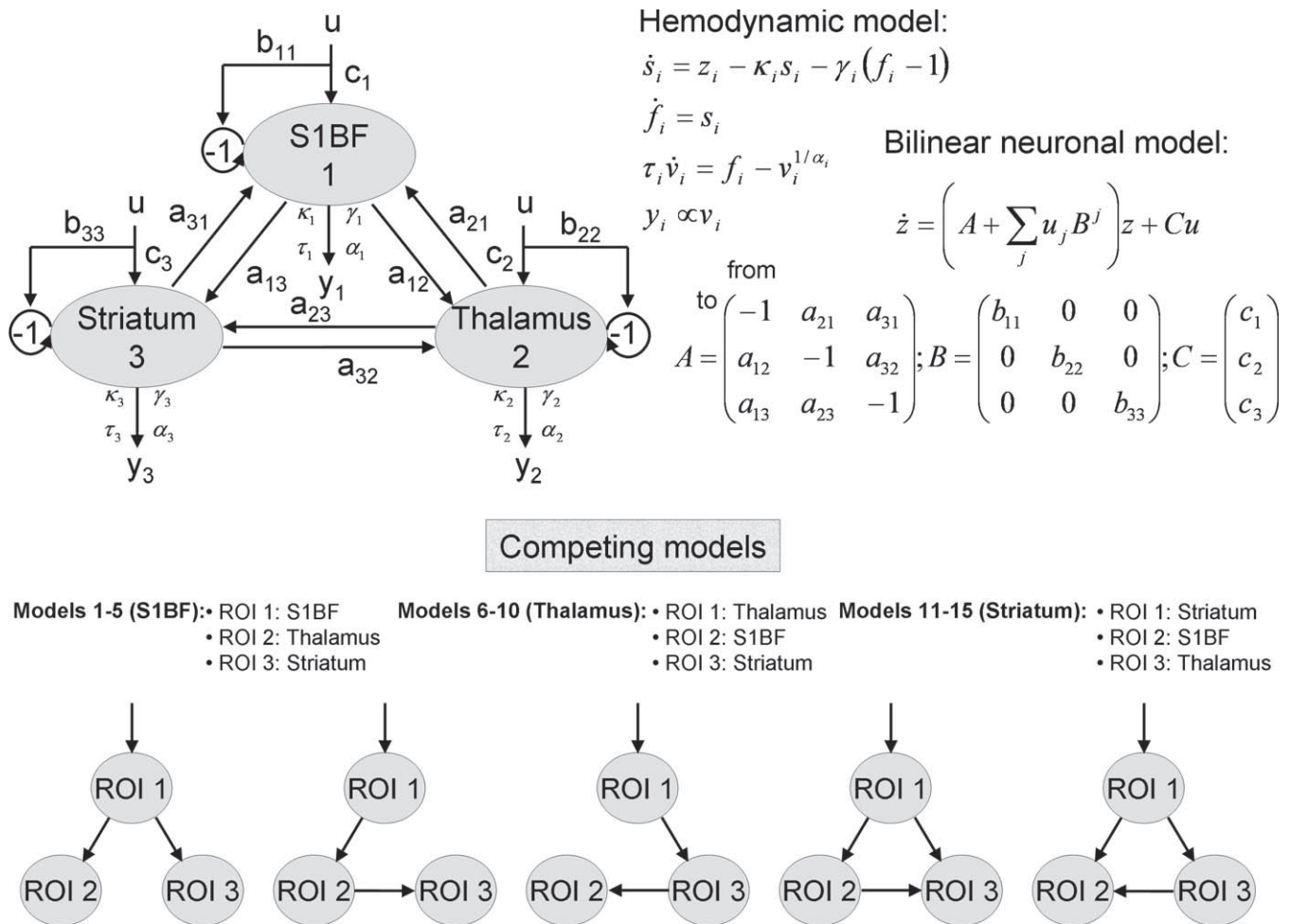


Figure 8. Dynamic Causal Model: Architecture and State Equations

Input u corresponds to detected epileptic events in the EEG. All parameters of the models are estimated from data y (CBV-weighted fMRI signals) using a Bayesian framework. Different configurations of the interregional connectivity A as shown in the competing models are used to estimate the putative neural driver, based on Bayesian model comparison. The 15 possible unidirectional models were generated from the five models shown in this figure using permutations on the ROI names (S1BF driver: models 1–5; thalamus driver: models 6–10; striatum driver: models 11–15). See main text for additional details. doi:10.1371/journal.pbio.0060315.g008

used to dissociate the driver and the driven systems, and we defined the direction of information transfer between X and Y using $\Delta(Y|X) - \Delta(X|Y)$. For each seizure, the normalised measure of generalised synchronisation Δ was computed on a time window (duration of 4 s to get sufficient number of time points for robust estimation of generalised synchronisation), which was translated every 200 ms between -2 s up to 8 s according to seizure onset. By using a sliding window, we were able to compute the evidence for directed connectivity as a function of peristimulus time, after SWDs onset.

Supporting Information

Protocol S1. Time Precedence and Neuronal Causality in fMRI Time Series

Reported is an intuitive view of the blurring effects of hemodynamics for the estimation of directional connectivity.

Found at doi:10.1371/journal.pbio.0060315.sd001 (41 KB DOC).

References

- Dayan P, Abbott LF (2001) Theoretical neuroscience: computational and mathematical modeling of neural systems. Cambridge (Massachusetts): Massachusetts Institute of Technology Press. 460 p.
- Engel AK, Fries P, Singer W (2001) Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. Nat Rev Neurosci 2: 704–716.

Protocol S2. Measures of Generalised Synchronisation

Reported are concepts and detailed equations used to quantify generalised synchronisation.

Found at doi:10.1371/journal.pbio.0060315.sd002 (86 KB DOC).

Acknowledgments

We are very grateful to Karl Friston for improvements suggested on an early draft of this manuscript. We thank Guerbet Research for providing us with Sinerem.

Author contributions. OD, IG, CD, CS, and AD conceived and designed the experiments. OD, IG, SS, SR, and AD performed the experiments. OD and SS analyzed the data. OD contributed reagents/materials/analysis tools. OD, IG, SS, CD, CS, and AD wrote the paper.

Funding. This study was funded by Inserm, Fondation de l'Avenir, Agence Nationale pour la Recherche and Région Rhône-Alpes.

Competing interests. The authors have declared that no competing interests exist.

- McIntosh AR (2000) Towards a network theory of cognition. Neural Netw 13: 861–870.
- Salinas E, Sejnowski TJ (2001) Correlated neuronal activity and the flow of neural information. Nat Rev Neurosci 2: 539–550.
- Friston K (2003) Learning and inference in the brain. Neural Netw 16: 1325–1352.

6. Angelucci A, Bressloff PC (2006) Contribution of feedforward, lateral and feedback connections to the classical receptive field center and extra-classical receptive field surround of primate V1 neurons. *Prog Brain Res* 154: 93–120.
7. Crick F, Koch C (1998) Constraints on cortical and thalamic projections: the no-strong-loops hypothesis. *Nature* 391: 245–250.
8. Felleman DJ, Van Essen DC (1991) Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 1: 1–47.
9. Sporns O, Tononi G, Edelman GM (2000) Theoretical neuroanatomy: relating anatomical and functional connectivity in graphs and cortical connection matrices. *Cereb Cortex* 10: 127–141.
10. Engel J Jr (2004) Models of focal epilepsy. *Suppl Clin Neurophysiol* 57: 392–399.
11. Friston KJ, Penny W, David O (2005) Modeling brain responses. *Int Rev Neurobiol* 66: 89–124.
12. Buchel C, Friston K (2001) Interactions among neuronal systems assessed with functional neuroimaging. *Rev Neurol (Paris)* 157: 807–815.
13. David O, Cosmelli D, Friston KJ (2004) Evaluation of different measures of functional connectivity using a neural mass model. *Neuroimage* 21: 659–673.
14. Friston KJ, Harrison L, Penny W (2003) Dynamic causal modelling. *Neuroimage* 19: 1273–1302.
15. McIntosh AR, Gonzalez-Lima F (1994) Network interactions among limbic cortices, basal forebrain, and cerebellum differentiate a tone conditioned as a Pavlovian excitator or inhibitor: fluorodeoxyglucose mapping and covariance structural modeling. *J Neurophysiol* 72: 1717–1733.
16. Quiñero R, Kraskov A, Kreuz T, Grassberger P (2002) Performance of different synchronization measures in real data: a case study on electroencephalographic signals. *Phys Rev E* 65: 041903.
17. Tononi G, McIntosh AR, Russell DP, Edelman GM (1998) Functional clustering: identifying strongly interactive brain regions in neuroimaging data. *Neuroimage* 7: 133–149.
18. Varela F, Lachaux J-P, Rodriguez E, Martinerie J (2001) The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nat Rev Neurosci* 2: 229–239.
19. Logothetis NK, Wandell BA (2004) Interpreting the BOLD signal. *Annu Rev Physiol* 66: 735–769.
20. Friston KJ, Mechelli A, Turner R, Price CJ (2000) Nonlinear responses in fMRI: the Balloon model, Volterra kernels, and other hemodynamics. *Neuroimage* 12: 466–477.
21. Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5: 347–360.
22. Lee SP, Duong TQ, Yang G, Iadecola C, Kim SG (2001) Relative changes of cerebral arterial and venous blood volumes during increased cerebral blood flow: implications for BOLD fMRI. *Magn Reson Med* 45: 791–800.
23. Friston K, Phillips J, Chawla D, Buchel C (2000) Nonlinear PCA: characterizing interactions between modes of brain activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 135–146.
24. Lahaye PJ, Poline JB, Flandin G, Dodel S, Garnero L (2003) Functional connectivity: studying nonlinear, delayed interactions between BOLD signals. *Neuroimage* 20: 962–974.
25. Roebroeck A, Formisano E, Goebel R (2005) Mapping directed influence over the brain using Granger causality and fMRI. *Neuroimage* 25: 230–242.
26. Bullmore E, Horwitz B, Honey G, Brammer M, Williams S, Sharma T (2000) How good is good enough in path analysis of fMRI data? *Neuroimage* 11: 289–301.
27. Danosier L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C (1998) Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol* 55: 27–57.
28. Depaulis A, van Luijckelaar G (2005) Genetic models of absence epilepsy. In: Pitkanen A, Schwartzkroin P, Moshe S, editors. *The rat models of seizures and epilepsy*. San Diego (California): Elsevier. pp. 233–248.
29. Vergnes M, Marescaux C, Depaulis A (1990) Mapping of spontaneous spike and wave discharges in Wistar rats with genetic generalized non-convulsive epilepsy. *Brain Res* 523: 87–91.
30. Polack PO, Guillemain I, Hu E, Deransart C, Depaulis A, et al. (2007) Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J Neurosci* 27: 6590–6599.
31. Meeren H, van Luijckelaar G, Lopes da Silva F, Coenen A (2005) Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol* 62: 371–376.
32. Meeren HK, Pijn JP, van Luijckelaar EL, Coenen AM, Lopes da Silva FH (2002) Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci* 22: 1480–1495.
33. Goebel R, Roebroeck A, Kim DS, Formisano E (2003) Investigating directed cortical interactions in time-resolved fMRI data using vector autoregressive modeling and Granger causality mapping. *Magn Reson Imaging* 21: 1251–1261.
34. Glover GH (1999) Deconvolution of impulse response in event-related BOLD fMRI. *Neuroimage* 9: 416–429.
35. Duncan JS (2007) Epilepsy surgery. *Clin Med* 7: 137–142.
36. van Luijckelaar G, Sitnikova E (2006) Global and focal aspects of absence epilepsy: the contribution of genetic models. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 983–1003.
37. Jasper HH, Kershman J (1941) Electroencephalographic classification of the epilepsies. *Arch Neurol Psychiatry* 45: 903–943.
38. Penfield WG, Jasper HH (1954) *Epilepsy and the functional anatomy of the human brain*. Boston (Massachusetts): Little, Brown. 896 p.
39. Avanzini G, Panzica F, de Curtis M (2000) The role of the thalamus in vigilance and epileptogenic mechanisms. *Clin Neurophysiol* 111: S19–S26.
40. Bal T, von Krosigk M, McCormick DA (1995) Role of the ferret perigeniculate nucleus in the generation of synchronized oscillations in vitro. *J Physiol* 483: 665–685.
41. Buzsaki G (1991) The thalamic clock: emergent network properties. *Neuroscience* 41: 351–364.
42. Steriade M, Contreras D (1995) Relations between cortical and thalamic cellular events during transition from sleep patterns to paroxysmal activity. *J Neurosci* 15: 623–642.
43. Steriade M, Contreras D (1998) Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. I. Role of neocortex and thalamus. *J Neurophysiol* 80: 1439–1455.
44. Timofeev I, Steriade M (2004) Neocortical seizures: initiation, development and cessation. *Neuroscience* 123: 299–336.
45. Coenen AM, van Luijckelaar EL (2003) Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet* 33: 635–655.
46. Aghakhani Y, Bagshaw AP, Benar CG, Hawco C, Andermann F, et al. (2004) fMRI activation during spike and wave discharges in idiopathic generalized epilepsy. *Brain* 127: 1127–1144.
47. Pevett MC, Duncan JS, Jones T, Fish DR, Brooks DJ (1995) Demonstration of thalamic activation during typical absence seizures using H2-15O and PET. *Neurology* 45: 1396–1402.
48. Marescaux C, Vergnes M, Depaulis A (1992) Neurotransmission in rats' spontaneous generalized nonconvulsive epilepsy. *Epilepsy Res Suppl* 8: 335–343.
49. Deransart C, Depaulis A (2002) The control of seizures by the basal ganglia? A review of experimental data. *Epileptic Disord* 4: S61–S72.
50. Deransart C, Riban V, Le B, Marescaux C, Depaulis A (2000) Dopamine in the striatum modulates seizures in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Neuroscience* 100: 335–344.
51. Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C (1994) Endogenous control of epilepsy: the nigral inhibitory system. *Prog Neurobiol* 42: 33–52.
52. Nersisyan H, Hyder F, Rothman DL, Blumenfeld H (2004) Dynamic fMRI and EEG recordings during spike-wave seizures and generalized tonic-clonic seizures in WAG/Rij rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 589–599.
53. Tenney JR, Duong TQ, King JA, Ferris CF (2004) FMRI of brain activation in a genetic rat model of absence seizures. *Epilepsia* 45: 576–582.
54. Iadecola C, Nedergaard M (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10: 1369–1376.
55. Chavez M, Martinerie J, Le Van QM (2003) Statistical assessment of nonlinear causality: application to epileptic EEG signals. *J Neurosci Methods* 124: 113–128.
56. Freiwald WA, Valdes P, Bosch J, Biscay R, Jimenez JC, et al. (1999) Testing non-linearity and directedness of interactions between neural groups in the macaque inferotemporal cortex. *J Neurosci Methods* 94: 105–119.
57. Marinazzo D, Pellicoro M, Stramaglia S (2006) Nonlinear parametric model for Granger causality of time series. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 73: 066216.
58. Pereda E, Rial R, Gamundi A, Gonzalez J (2001) Assessment of changing interdependencies between human electroencephalograms using nonlinear methods. *Physica D* 148: 147–158.
59. Stark J, Broomhead DS, Davies ME, Huke J (2003) Delay embeddings for forced systems. II. Stochastic forcing. *J Nonlinear Sci* 13: 519–577.
60. David O, Friston KJ (2003) A neural mass model for MEG/EEG: coupling and neuronal dynamics. *Neuroimage* 20: 1743–1755.
61. Deichmann R, Schwarzbauer C, Turner R (2004) Optimisation of the 3D MDEFT sequence for anatomical brain imaging: technical implications at 1.5 and 3 T. *Neuroimage* 21: 757–767.
62. Paxinos G, Watson C (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego (California): Academic Press.
63. Schweinhardt P, Fransson P, Olson L, Spenger C, Andersson JL (2003) A template for spatial normalisation of MR images of the rat brain. *J Neurosci Methods* 129: 105–113.
64. Gotman J, Kobayashi E, Bagshaw AP, Benar CG, Dubeau F (2006) Combining EEG and fMRI: a multimodal tool for epilepsy research. *J Magn Reson Imaging* 23: 906–920.
65. Salek-Haddadi A, Lemieux L, Merschhemke M, Friston KJ, Duncan JS, et al. (2003) Functional magnetic resonance imaging of human absence seizures. *Ann Neurol* 53: 663–667.
66. Mirsattari SM, Wang Z, Ives JR, Bihari F, Leung LS, et al. (2006) Linear aspects of transformation from interictal epileptic discharges to BOLD fMRI signals in an animal model of occipital epilepsy. *Neuroimage* 30: 1133–1148.
67. Friston KJ, Stephan KE, Lund TE, Morcom A, Kiebel S (2005) Mixed-effects and fMRI studies. *Neuroimage* 24: 244–252.
68. Friston KJ, Holmes AP, Worsley KJ (1999) How many subjects constitute a study? *Neuroimage* 10: 1–5.
69. Aguirre GK, Zarahn E, D'Esposito M (1998) The variability of human, BOLD hemodynamic responses. *Neuroimage* 8: 360–369.
70. Hawco CS, Bagshaw AP, Lu Y, Dubeau F, Gotman J (2007) BOLD changes

- occur prior to epileptic spikes seen on scalp EEG. *Neuroimage* 35: 1450–1458.
71. Kang JK, Benar C, Al-Asmi A, Khani YA, Pike GB, et al. (2003) Using patient-specific hemodynamic response functions in combined EEG-fMRI studies in epilepsy. *Neuroimage* 20: 1162–1170.
 72. Mandeville JB, Jenkins BG, Chen YC, Choi JK, Kim YR, et al. (2004) Exogenous contrast agent improves sensitivity of gradient-echo functional magnetic resonance imaging at 9.4 T. *Magn Reson Med* 52: 1272–1281.
 73. Friston KJ, Penny W, Phillips C, Kiebel S, Hinton G, et al. (2002) Classical and Bayesian inference in neuroimaging: theory. *Neuroimage* 16: 465–483.
 74. Neumaier A, Schneider T (2001) Estimation of parameters and eigenmodes of multivariate autoregressive models. *ACM Trans Math Softw* 27: 27–57.
 75. Schneider T, Neumaier A (2001) Algorithm 808: ARfit—a Matlab package for the estimation of parameters and eigenmodes of multivariate autoregressive models. *ACM Trans Math Softw* 27: 58–65.
 76. Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *Ann Stat* 6: 461–464.
 77. Schreiber T (2000) Surrogate time series. *Physica D* 142: 346–382.
 78. Penny WD, Stephan KE, Mechelli A, Friston KJ (2004) Comparing dynamic causal models. *Neuroimage* 22: 1157–1172.
 79. Garrido MI, Kilner JM, Kiebel SJ, Stephan KE, Friston KJ (2007) Dynamic causal modelling of evoked potentials: a reproducibility study. *Neuroimage* 36: 571–580.
 80. Boccaletti S, Kurths J, Osipov G, Valladares DL, Zhou CS (2002) The synchronization of chaotic systems. *Phys Rep* 366: 1–101.
 81. Schiff SJ, So P, Chang T, Burke RE, Sauer T (1996) Detecting dynamical interdependence and generalized synchrony through mutual prediction in a neural ensemble. *Phys Rev E* 54: 6708–6724.

Chapitre 9

IRM fonctionnelle de la stimulation du nerf vague

9.1 Introduction : genèse de l'étude

Une fois les paramètres expérimentaux de l'IRMf validés sur la stimulation du système périphérique, il semblait intéressant de se rapprocher du système nerveux central. La stimulation du nerf vague (SNV) permettrait de provoquer des activations centrales dans d'autres zones que le cortex sensoriel moteur, tout en ne comportant pas d'électrode de stimulation dans le cerveau. Les images ne sont donc pas affectées par la présence de l'électrode, et la SNV constitue une dernière étape de la validation de la technique d'IRMf de la stimulation.

Ce travail est le fruit de la collaboration avec l'équipe 8 du GIN, « Stress et Interactions Neurodigestives », qui pratique la SNV chez le rat et étudie son rôle anti-inflammatoire au niveau des intestins. Comme nous l'avons vu en 3.1, la SNV est utilisée en traitement de certaines épilepsies. Mais ici, ce sont les efférences du nerf vague qui sont censées être activées, notamment par l'utilisation de fréquences plus basses (5 Hz environ) que celles utilisées en épilepsie (30 Hz environ). L'objectif de l'étude était donc d'observer d'éventuels effets centraux de la stimulation, qu'ils jouent un rôle ou non dans les effets anti-inflammatoires sur l'intestin.

9.2 Premiers résultats

Dès les premiers essais expérimentaux, de très fortes diminutions de signal ont été détectées lors de la SNV. De telles variations ne pouvaient pas correspondre à des modifications hémodynamiques causées par des activations neuronales.

Ces variations de BOLD correspondent en fait à une baisse du débit sanguin cérébral, provoquées par une diminution du rythme cardiaque. En effet, le nerf vague a un effet inhibiteur sur les muscles cardiaques, et une activation de ce dernier entraîne une diminution du rythme cardiaque.

Pourtant, normalement, seul le nerf vague droit est censé influencer sur le cœur, et c'est pourquoi les implantations d'électrodes de SNV se font toujours à gauche. Mais ici, le confinement

des deux nerfs vagues chez le rat et l'utilisation pour la chirurgie d'électrodes conçues pour l'homme, fait que le nerf vague droit est certainement légèrement activé lors de la stimulation.

De plus, lors de la SNV, nous observons parfois des variations de la fréquence respiratoire, voire des apnées prolongées de quelques secondes.

Toutefois, le siège des plus importantes déactivations observées correspondait au noyau du tractus solitaire, noyau d'entrée du nerf vague. Même si il est évident que les effets sur le cœur jouent un rôle important, il semblait probable qu'il y ait une composante supplémentaire, spécifique à la stimulation du nerf vague. Tout l'enjeu fut donc de découpler les effets cardiaques des effets neuronaux.

9.3 Modulation de la fréquence cardiaque par la SNV

Les effets de la SNV sur la fréquence cardiaque ont fait l'objet de manipulations de la coauteur de l'article (Picq (2012)), qui a étudié ces variations par stimulation du nerf vague droit et gauche à différentes fréquences.

Sur la figure 9.1, on remarque que la stimulation du nerf vague droit induit de très fortes variations de la fréquence cardiaque, en corrélation avec la fréquence de la stimulation. La stimulation du nerf vague gauche, *a contrario*, provoque de plus faibles variations de rythme cardiaque, constantes quelque soit la fréquence de stimulation.

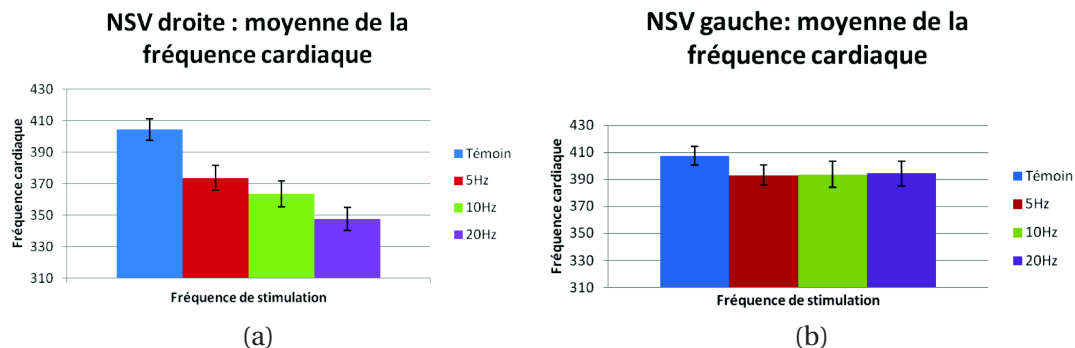


FIGURE 9.1 – (a) Variation de la moyenne sur 3 minutes de la fréquence cardiaque pour 3 fréquences de stimulation du nerf vague **droit** pour un rat. Moyenne de la fréquence cardiaque : groupe témoin → 404 bpm ; 5 Hz → 373 bpm ; 10 Hz → 363 bpm ; 20 Hz → 347 bpm.

(b) Variation de la moyenne sur 3 minutes de la fréquence cardiaque pour 3 fréquences de stimulation du nerf vague **gauche** pour un rat. Moyenne de la fréquence cardiaque : groupe témoin → 407 bpm ; 5 Hz → 393 bpm ; 10 Hz → 393 bpm ; 20 Hz → 394 bpm.

D'après Picq (2012).

De plus, Picq (2012) précise que la stimulation aux fréquences de 10 Hz à 20 Hz provoque des effets respiratoires tels que des apnées ou de multiples pauses respiratoires.

Ces expériences montrent bien qu'il est préférable de stimuler le nerf vague gauche à une fréquence de 5 Hz, et ce sont les paramètres qui ont été choisis pour les expériences d'IRMf de la SNV.

9.4 Observation de la composante hémodynamique cérébrale lors d'une augmentation de rythme cardiaque

J'ai alors effectué des expériences d'IRM de la variation du rythme cardiaque, où les modifications du signal BOLD lors d'une augmentation pharmacologique du rythme cardiaque furent comparées à celles de la SNV.

Cette étude a porté sur sept rats Wistar mâles. La tachychardie a été induite par injection intraveineuse (dans la veine de la queue) d'un bolus d'éphedrine. Les détails méthodologiques de cette expérience se trouvent dans les matériels supplémentaires, page 109.

Comme le montre la figure page 112, le changement de rythme cardiaque occasionne des variations de l'ordre de 10 % de signal BOLD, bien plus grandes que celles engendrées par des activations neuronales (5 % maximum). Pourtant, ces activations observées ne se superposent pas tout à fait avec les désactivations observées en SNV, montrant que les effets observés en SNV ne sont pas dus uniquement à la diminution du rythme cardiaque (figure page 113).

9.5 Article n° 2 :

Dynamic Causal Modelling and Physiological Confounds : A Functional MRI Study of Vagal Nerve Stimulation

Bien que nous ayons montré que les désactivations observées lors de la SNV n'étaient pas uniquement dues aux variations de rythme cardiaque, la composante cardio-respiratoire reste une évidence. Nous avons pu découpler ces deux effets grâce à la modélisation causale dynamique (DCM), et ceci a fait l'objet d'un article paru dans *Neuroimage*, que je présente maintenant, suivi d'un complément à l'article publié avec ce dernier, comportant les expériences annexes au sujet principal.



Contents lists available at ScienceDirect

NeuroImage

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynimg

Dynamic Causal Modelling and physiological confounds: A functional MRI study of vagus nerve stimulation

Sébastien Rey^{a,d,1}, Chloé Picq^{b,c,d,1}, Valérie Sinniger^b, Didier Clarençon^{b,c},
Bruno Bonaz^{b,f}, Olivier David^{a,d,e,*}

^a Neuroimagerie Fonctionnelle et Métabolique, Inserm, U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France

^b Stress et Interactions Neuro-Digestives (SIND; EA3744), Inserm, U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France

^c Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Antenne de La Tronche, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, France

^d Université Joseph Fourier, Grenoble, France

^e Service de Neuroradiologie et Unité IRM, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France

^f Clinique Universitaire d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 March 2010

Revised 23 April 2010

Accepted 7 May 2010

Available online 21 May 2010

ABSTRACT

Dynamic Causal Modelling (DCM) has been proposed to estimate neuronal connectivity from functional magnetic resonance imaging (fMRI) using a biophysical model that links synaptic activity to hemodynamic processes. However, it is well known that fMRI is sensitive not only to neuronal activity, but also to many other psychophysiological responses which may be task-related, such as changes in cardio-respiratory activity. They are not explicitly taken into account in the generative models of DCM and their effects on estimated neuronal connectivity are not known. The main goal of this study was to report the face validity of DCM in the presence of strong physiological confounds that presumably cannot be corrected for, using an fMRI experiment of vagus nerve stimulation (VNS) performed in rats. First, a simple simulation was used to evaluate the principled ability of DCM to recover directed connectivity in the presence of a confounding factor. Second, we tested the experimental validity using measures of the BOLD correlates of left 5 Hz VNS. Because VNS mostly activates the central autonomic regulation system, fMRI signals were likely to represent both direct and indirect vascular responses to such activation. In addition to the inference of standard statistical parametric maps, DCM was thus used to estimate directed neural connectivity in a small brain network including the nucleus tractus solitarius (NTS) known to receive vagal afferents. Though blood pressure changes may constitute a major physiological confound in this dataset, model comparison of DCMs still allowed the identification of the NTS as the input station of the VNS pathway to the brain. Our study indicates that current developments of DCM are robust to psychophysiological responses to some extent, but does not exclude the need to develop specific models of brain – body interactions within the DCM framework to better estimate neuronal connectivity from fMRI time series.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Dynamic Causal Modelling (DCM) (Friston et al., 2003) has been proposed to estimate neuronal connectivity from functional magnetic resonance imaging (fMRI) time series weighted by the blood oxygen level dependent (BOLD) contrast. It is based on a generative model that links synaptic activity to BOLD time series using a hemodynamic model. Observation equations of the hemodynamic model transform the synaptic activity into a vasodilatory signal, cerebral blood flow, cerebral blood volume and deoxyhaemoglobin content that are combined together to give rise to the BOLD signal (Friston et al.,

2000). Synaptic activity amongst different brain regions of interest (ROI) is obtained using state equations that are differential equations derived directly from assumed intrinsic and extrinsic neuronal connectivity (see (Friston et al., 2003) for mathematical details). We have recently shown that estimating this hidden neuronal activity is crucial to identifying appropriate orientation of interactions from fMRI time series (David et al., 2008).

DCM has been used in humans to study several cognitive systems such as language (Mechelli et al., 2005), visuospatial attention (Siman-Tov et al., 2007) or face perception (Fairhall and Ishai, 2007). Furthermore, reproducibility of DCM results over scans within the same scan session has been found to be excellent in an experiment on emotional facial expressions (Schuyler et al., 2009). However, it is well known that BOLD fMRI is sensitive not only to task-related neuronal processes, but also to many physiological responses of the central autonomic regulation system (Cechetto and Shoemaker, 2009;

* Corresponding author. Grenoble Institut des Neurosciences–Inserm U836, Chemin Fortuné Ferrini–Bât EJ Safra, 38700 La Tronche, France. Fax: +33 456520598.

E-mail address: odavid@ujf-grenoble.fr (O. David).

¹ These authors contributed equally to this work.

Saper, 2002), such as changes in blood pressure related to cardio-respiratory activity (Birn et al., 2006; Dagli et al., 1999; de Munck et al., 2008; Gray et al., 2009; Wise et al., 2004). If they are directly measured, they can be either removed from the data before any connectivity analysis, for instance using subspace projection, or incorporated explicitly in a generative model of the data, such as a DCM, on which connectivity inferences will be performed. When they are task-related however, these physiological responses are correlated to neuronal responses of interest and thus are difficult to remove during the preprocessing of data. Approaches based on partial correlation, such as partial Granger causality (Guo et al., 2008), then allow to model confounds as latent variables for improved estimation of causal relationships amongst measured time series. Because they are not explicitly taken into account in the generative models of the current release of DCM (www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm8, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, University College London), the effects of task-related physiological confounds have rarely been considered when interpreting DCM results. The main goal of this study was to report the face validity of DCM for fMRI in the presence of strong physiological confounds that cannot be corrected for, because of lack of experimental measures or lack of differentiability between effects of interest and non interest, using an fMRI experiment of vagus nerve stimulation (VNS) performed in rats.

Although mechanisms of action of VNS remain poorly understood, VNS is used in humans for treatment-resistant depression and epilepsy (Ben Menachem, 2002; Marangell et al., 2007; Milby et al., 2008). It has also been proposed to use VNS as a modulator of intestinal inflammation through the cholinergic anti-inflammatory pathway (Bonaz, 2007; Van Der Zanden et al., 2009). On the one hand, effects observed on the central nervous system are mediated through vagal afferents (80% of VN fibres), which usually are intermittently stimulated at 30 Hz. On the other hand, VN efferent fibres (20%) provide parasympathetic innervation primarily to the lungs, heart, and gastrointestinal tract and have anti-inflammatory properties, i.e. the cholinergic anti-inflammatory pathway (Borovikova et al., 2000; Tracey, 2009). Current range frequency of VNS protocols for these purposes is 5–10 Hz (Bernik et al., 2002; Naritoku et al., 1995; Tracey, 2007).

Because the nucleus tractus solitarius (NTS), located in the brainstem, receives vagal afferent fibres, central effects of VNS are thought to be mediated through the numerous projections of the NTS into other brain regions. Neurochemical studies (Ben-Menachem et al., 1995; Hamberger et al., 1993; Kralh et al., 1998; Naritoku et al., 1995) suggested activation by VNS of the locus coeruleus and dorsal raphe nucleus, the major sources of brain norepinephrine and serotonin respectively. This has been confirmed electrophysiologically by showing increases in neuronal firing rates in those structures after acute VNS (Groves et al., 2005) or after long-term stimulation treatment in rats (Dorr and Debonnel, 2006). In humans *in vivo*, central effects of VNS, usually performed at about 30 Hz, have been studied mostly using electroencephalography (EEG) (Marrosu et al., 2005), positron emission tomography (PET) and single photon emission computer tomography (SPECT) (see (Chae et al., 2003) for a review) and functional magnetic resonance imaging (fMRI) (Bohning et al., 2001; Dietrich et al., 2008; Liu et al., 2003; Lomarev et al., 2002; Nahas et al., 2007; Narayanan et al., 2002; Sucholeiki et al., 2002). Despite a significant variability in reported findings, activations in the medulla/brainstem, limbic regions (insula, anterior cingulate cortex, hippocampus, amygdala, and hypothalamus), thalamus, cerebellum, and periaqueductal grey (PAG) were most commonly observed. In animals, information about VNS mechanisms gathered from neuroimaging studies is scarce (Biraben et al., 2008; Dedeurwaerdere et al., 2005). Because of the modulatory properties of VNS on the central autonomic regulation system, the origins of BOLD effects observed during VNS might not only be glial and neuronal but also be strongly related to other physiological processes. The medullary nuclei targeted by VN indeed couple cardiac function to blood pressure and respiration, the fMRI correlates of which are detectable in humans

(Gray et al., 2009). VNS is thus an interesting experimental setup to investigate the behaviour of biophysical models used to analyse fMRI signals to detect neural effect, as proposed in DCM.

Here, we first used a simple simulation to evaluate the principle ability of DCM to recover directed connectivity in the presence of a confounding factor strongly correlated to the experimental design. Second, we tested the experimental validity of this approach using measures of the BOLD correlates of left 5 Hz VNS specifically acquired in Sprague–Dawley rats at 4.7 T. In [Supplementary materials](#), we provide a series of control experiments (heart rate changes during 5 Hz VNS, fMRI of VNS in vagotomised rats, fMRI during ephedrine injection) to ascertain the presence in our dataset of neuronal and non neuronal effects, through the activation of the central autonomic regulation system. Interestingly, though changes in blood pressure or in heart rate may constitute a major physiological confound in this dataset (see [Fig. S2 in Supplementary materials](#) for experimental evidence of tight correlation between BOLD and heart rate), model comparison of families of DCMs still allowed the identification of the NTS as the input station of the VNS pathway to the brain.

Materials and methods

Animals

Adult male Sprague–Dawley rats (250–350 g) (Charles River, France) were housed in a controlled environment (12 h light/dark cycles, 20–22 °C) with food and water *ad libitum*. Animals were allowed a minimum of 7 days to adapt to housing conditions before any manipulation. All animals were treated according to guidelines approved by the European Ethics Committee (decree 86/609/CEE). Procedures were approved by the institutional animal welfare committees of the Grenoble Institute of Neuroscience, of the Institut de Recherche Biomédicale des Armées and of the legal French Ministry of Agriculture (authorization number 38 04 48).

A total number of 25 rats were used in this study. Eight animals were used for fMRI of VNS. In [Supplementary materials](#), validation of VNS parameters was done on 6 rats; 4 animals underwent vagotomy and VNS fMRI; and 7 animals were used to measure ephedrine effects in fMRI.

VNS surgery and parameters

Oxygen saturation and heart rate were monitored during surgery. Anaesthesia was induced with 5% isoflurane in air/oxygen mixture (8:2) and maintained during surgery at 2.5%. An incision was made over the ventral region of the neck. Then the left (or right for the first experiment comparing left and right VNS) VN and the carotid artery were isolated. A bipolar electrode (Cyberonics Inc., Webster, Texas, USA) was gently wrapped around the pack and connected to a stimulation chain: S88 stimulator, SIU5 isolation unit, CCU1 constant current unit (Grass Technologies, Astro-Med, RI, US). VNS was performed using biphasic pulses with the following parameters: 1 mA, 5 Hz, 500 μ s pulse width and cycle of 9 s ON/51 s OFF.

Animal preparation for fMRI

Immediately after electrode implantation, a bolus of 0.5 mL/kg dexmedetomidine (Dexdomitor, Pfizer) was administered in the hind limb muscle on a 1 minute basis, and isoflurane was discontinued to maximize the specificity of BOLD activations (Weber et al., 2006). Animals were then placed in a rat holder (Bruker, Germany) and fixed with tooth bar and ear plugs to prevent any motion. Respiratory rate, temperature and heart rate were visually monitored throughout fMRI experiments. ECG was recorded using two gold plated electrodes and conductive gel fixed with micropore surgical tape placed on the right forelimb and the left hind limb. Experiments where animals presented

abnormal respiratory patterns were discontinued and these animals were removed from the study. Body temperature was maintained by a water-circulating heating-pad. All physiological measures were done with a MR-compatible small animal monitoring and gating system (Model 1025, SA Instruments Inc., Stony Brook, NY, USA). The electrode was connected to the stimulator, and animals were inserted in the magnet. Animals were freely breathing an air/O₂ mixture (9:1) during fMRI experiments that lasted no longer than 60 minutes. At the end of fMRI experiments, animals were anesthetized with 2.5% isoflurane in air/O₂ mixture during removal of electrode. They were then euthanized with an intracardiac injection of Pentobarbital (Dolethal®; 200 mg/kg).

MR parameters

fMRI experiments were performed on a 4.7 T Bruker Avance III horizontal animal scanner, equipped with a 21 cm shielded gradient system (600 mT/m). Radiofrequency transmission was achieved with a 12 cm diameter volume coil, and the resonance signal was received with a surface coil placed over the head of the animal to allow an optimal recording of the brain and brainstem. Both coils were actively decoupled from each other.

FLASH pilot slices in three directions were acquired to position the animal in the magnet with the plane of the interaural line at the magnet center. A field map was then acquired, and shimming on whole brain was performed using MapShim (Bruker). Final shim was within 50 Hz on the entire brain for each animal. Anatomical images were acquired for brain normalization using a RARE sequence: TE = 13.125 ms; effective 52.5 ms; TR = 5800 ms; RARE factor = 8; acquisition time = 3 min 30 s.

Once all physiological parameters were stabilized, three fMRI sessions of 10 min duration each were acquired. BOLD signals were obtained using coronal multi-slice gradient-echo EPI with the following parameters: TE = 30 ms (echo position 33%, no zero-filling); TR = 3 s; BW = 200 kHz; flip angle 75; 25 consecutive slices of 1 mm thickness; FOV = 25.6 × 25.6 mm; matrix of 64 × 64 pixels, allowing a spatial resolution of 0.4 × 0.4 × 1 mm.

A standard block design was used for VNS, alternating ON and OFF periods expressed in scans as follows: 10 OFF + 9 × [3 ON + 17 OFF] + 3 ON + 7 OFF. Duration of each session was 10 min. Animals were allowed to rest for at least 7 minutes between two successive sessions.

fMRI data analysis

Standard fMRI data analysis was done using SPM5 (www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm), Statistical Parametric Mapping, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, Functional Imaging Laboratory, London, UK). Some routines of this software were adapted to rat imaging in accordance with (Schweinhardt et al., (2003)). DCM analyses were performed using SPM8.

Preprocessing

For each session, EPI volumes were first realigned to account for motion correction. Then all images were normalised to a template with coordinates chosen according to the rat atlas of Paxinos and Watson, with the origin at the bregma (Paxinos and Watson, 1997). Practically, we used the T2 template kindly provided by Schweinhardt et al., who have provided useful guidelines to construct specific small animal templates on any MR system (Schweinhardt et al., 2003). Normalised images were resampled to reach an isotropic spatial resolution of 0.4 mm. Finally, normalised EPI images were smoothed with a Gaussian kernel of 0.8 mm FWHM, and detrended using a high-pass filter based on the discrete cosine transform (standard cutoff of 1/128 s).

Statistical maps of BOLD changes

Statistical analysis of BOLD signals was done on smoothed, normalised and realigned EPI images. The regressor of interest was

obtained by convolving the VNS paradigm with the canonical hemodynamic response function provided in SPM5. For each animal, maps of the *t*-statistic of activations were obtained by correlating the high-pass filtered time series of each voxel with the regressor of interest using a standard first-level statistical design (Friston et al., 2005). Activations at the group level were obtained using a fixed-effect analysis following guidelines provided in (Friston et al., (1999)). The decision to perform a fixed-effect analysis was based (i) on the reduced number of animals in each condition, which was too small to perform a random-effect analysis, and (ii) on the good reproducibility between animals of the activation patterns.

Dynamic Causal Modelling

In DCM for fMRI (Friston et al., 2003), a bilinear neuronal state equation specifies the connectivity between brain regions. The synaptic activity is then transformed into BOLD signals using a hemodynamic model. Knowing the data and the stimulus input (VNS paradigm), DCM proceeds to a conjoint estimation, from the measured BOLD time series, of the neuronal connectivity and of the hemodynamic parameters. The evidence of a dynamic causal model is defined by its marginal likelihood obtained after model optimisation (Penny et al., 2004). Comparing competing models can thus readily be performed by comparing the model evidence (the most plausible model is the one with the largest evidence). Here, the model-log evidence was approximated by the model negative free energy. The free energy is the quantity (objective function) optimised by variational Bayes methods implemented in SPM8 for DCM (Friston et al., 2007). It provides a bound on the log-evidence for any model (exact for linear models). Assuming each dataset is independent of the others and that only one model underlies brain responses, the log-evidence at the group level in a fixed-effect (FFX) analysis is simply obtained by adding the log-evidence of each session (Garrido et al., 2007). To diminish the sensitivity to outliers, which may be important in small group samples, and to the possibility that various brains react differently to the same stimulus, a methodology for random-effect (RFX) analysis of group model evidences has recently been proposed (Stephan et al., 2009). We performed both FFX and RFX analyses on actual data for comparing group evidence using DCM code as implemented in SPM8.

When many models are compared together, finding “the best model” may be inadequate because of the large number of experimental factors and modelling approximations that remain insufficiently controlled to detect small differences amongst models. To overcome this shortcoming, it has been proposed very recently to combine family level inference and Bayesian model averaging within families (Penny et al., 2010). Family level inference indeed removes uncertainty about aspects of model structure other than the characteristic of interest. Here, we tested whether DCM was able to recover two aspects from known neuroanatomy: (i) the NTS receives vagal afferents; and (ii) interregional connectivity is largely bidirectional.

To estimate whether VNS activations could be explained by propagation of NTS neural activity, after receiving all vagal afferents, the time series of deactivated regions by VNS were first extracted. Second, according to observed deactivations, five ROIs were delineated from the rat atlas of (Paxinos and Watson, (1997)) and were chosen as follows (Fig. 1 and Table 1): NTS, cingulate cortex (Cg), retrosplenial granular cortex (RSG), anterior hippocampus (restricted to CA1), and insula (AI). ROI time series were obtained for each session using the SPM ROI tool, which computes the first scaled eigenvariate (i.e. weighted mean) of the time series of voxels (between 130 and 200 voxels per ROI, on average) selected by applying the anatomical mask of the ROI (Fig. 1) on the map of negative *t*-values, thresholded at *p* < 0.001 uncorrected. Finally, 410 DCMs were generated as follows, in a constrained way because it was not practically feasible to test all possible models: given 5 ROIs, there exist 41 possible graphs which connect uni-directionally ROI 1 to the

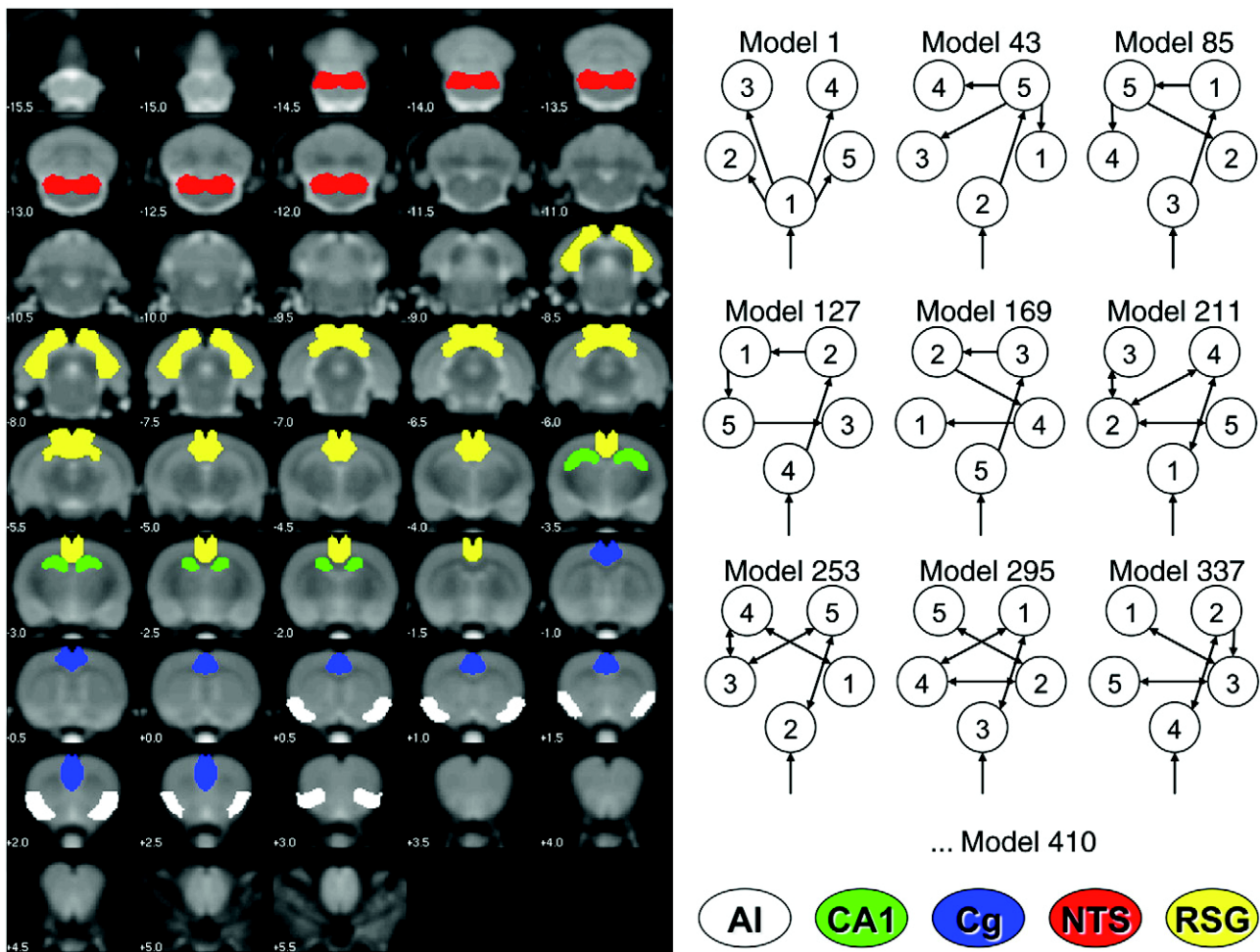


Fig. 1. Dynamic Causal Modelling of VNS in rat. Left: regions of interest are superimposed on a T2 rat template (coronal slices shown every 0.5 mm, in posterior to anterior order). Right: nine amongst the 410 tested DCMs of VNS. NTS: nucleus tractus solitarius; CA1: hippocampus (anterior part); AI: insular cortex; RSG: retrosplenial granular cortex; Cg: cingulate cortex.

others (with serial or parallel connections, ROI 1 receiving an extrinsic input modelling VNS afferents). Assuming that all regions could potentially receive the VNS input, $41 \times 5 = 205$ unidirectional models with a single extrinsic input were generated and estimated. The location of the extrinsic input defined a family of model (named according to the input station) and the point (i) above (whether DCM for fMRI estimated the NTS as being the input station of VNS) was addressed by using Bayesian model comparison (FFX and RFX) of the

five families. In addition, 205 bidirectional models were generated from the previous 205 unidirectional models and fitted to the data. By comparing the two families defined by unidirectional and bidirectional connections, the point (ii) above (whether DCM estimates bidirectional long range brain connectivity) was finally investigated.

Simulation

To evaluate the sensitivity of DCM to detect causal relationships as a function of the amplitude of confounds, we set up a toy model: 2 ROIs were considered (1 & 2) that were mutually connected with a weight of 0.7. Time series of 10 min duration were generated with parameters similar to those in MR parameters Experimental Section II.4: 180 scans, $TR = 3$ s, input u on ROI 1 the same as the VNS function. Time series y_1 and y_2 of ROIs 1 & 2 were generated by integrating the following state equations:

$$\begin{cases} \dot{x}(t) = \begin{bmatrix} -1 & 0.7 \\ 0.7 & -1 \end{bmatrix} x(t) + \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix} u(t) \\ y(t) = h(x(t)) + \epsilon(t) \end{cases} \quad (1)$$

where $\dot{x} = \frac{dx}{dt}$, t is time, $x = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix}$ are the neuronal states and $y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \end{bmatrix}$ are BOLD time series obtained from x using the hemodynamic model h with canonical parameters as described in (Stephan et al., (2009)). Normally distributed random noise with unit variance, $\epsilon(t)$, was assumed to model physiological and experimental noise

Table 1
List of ROIs used in DCM. See Fig. 1. Coordinates indicate the centre of ROIs, in the atlas of Paxinos and Watson referenced to bregma (Paxinos and Watson, 1997). D-V: dorso-ventral; M-L: medio-lateral; A-P: antero-posterior.

DCM ROI	Anatomical structures	Abbreviations in Paxinos and Watson atlas	Centre coordinates		
			D-V	M-L	A-P
AI	Nucleus of the solitary tract/ vestibular nucleus	Sol/VE	−8	±1.2	−13.2
CA1	Field CA1 of hippocampus	CA1	−3	±1.2	−2.8
Cg	Cingulate cortex	Cg1/Cg 2	−2.4	±0.3	0.5
NTS	Nucleus of the solitary tract/ vestibular nucleus/prepositus nucleus/intercalated nucleus of the medulla/ gracile nucleus	Sol/VE/Pr/In/Gr	−8	±1.2	−13.2
RSG	Granular and agranular retrosplenial cortex	RSGa/RSGb/RSA	−1.7	±0.8	−5.6

uncorrelated to stimulation $u(t)$. Positive parameter σ allowed to tune signal-to-noise ratio (SNR).

Physiological confounds c were defined as:

$$c = \frac{y_1 + y_2}{2}. \quad (2)$$

They were thus highly correlated to BOLD time series y generated by neuronal activity x . Measured time series m were assumed to be a linear combination of y and c :

$$m = y + \begin{bmatrix} r \\ r \end{bmatrix} c \quad (3)$$

where r is the confound to neuronal hemodynamic response ratio. It was then varied from 0 (no confound) to 10. SNR was defined as the ratio between the standard deviations of $m(t)$ and of $\sigma\varepsilon(t)$, and was varied between 5 and 1. For each tested values of the pair $[r, \text{SNR}]$, generated time series $m(t)$ were fitted using two models: the true model (model A) as described by the neuronal state Equation (1), and two false models in which the extrinsic input impinged on ROI 2 only (model B), or on both ROIs (model C) (Fig. 2).

The influence of the confounds c on DCM ability to detect true directionality of information flow between ROI 1 and ROI 2 was evaluated by plotting the difference in log model evidence (approximated by the negative free energy) of models A, B and C, as a function of r and of SNR.

Results

Simulation

Fig. 2A shows two minutes of simulated time series with hemodynamic response function (HRF) amplitude normalised to 1 for display. The “true” generative model used here is defined by Equation (1). The three first panels show different degrees of contamination by confounds (common mode of original time series) defined by different values of parameter r , without random noise (SNR = Inf, i.e. $\sigma = 0$). As one might expect from the design of this simple simulation, increasing r induced a reduction of the time delay between the activity of ROIs 1 & 2, and therefore challenged the detection of information flow from ROI 1 towards ROI 2. The three last panels show examples of simulated BOLD time series for the different values of SNR.

Fig. 2B shows the difference of negative free energy (approximate of log model evidence) between Models A & B (top) and Models A and C (bottom), when fitted to data shown in Fig. 2A and averaged over 50 realisations, as a function of parameter r and SNR. When r increased, model evidences decreased (global effect of confounds not shown) and also the difference of log evidence between the Models A & B. The effect of random noise (quantified by the SNR) was similar to that of correlated confound. Model A (true model) always remained more plausible than Model B (indicated a false position of the extrinsic input), as indicated by its largest log evidence. However, the difference between Models A & C was not significant (a value of 3 if log evidence being a common threshold value for significance), whatever the degree of noise considered.

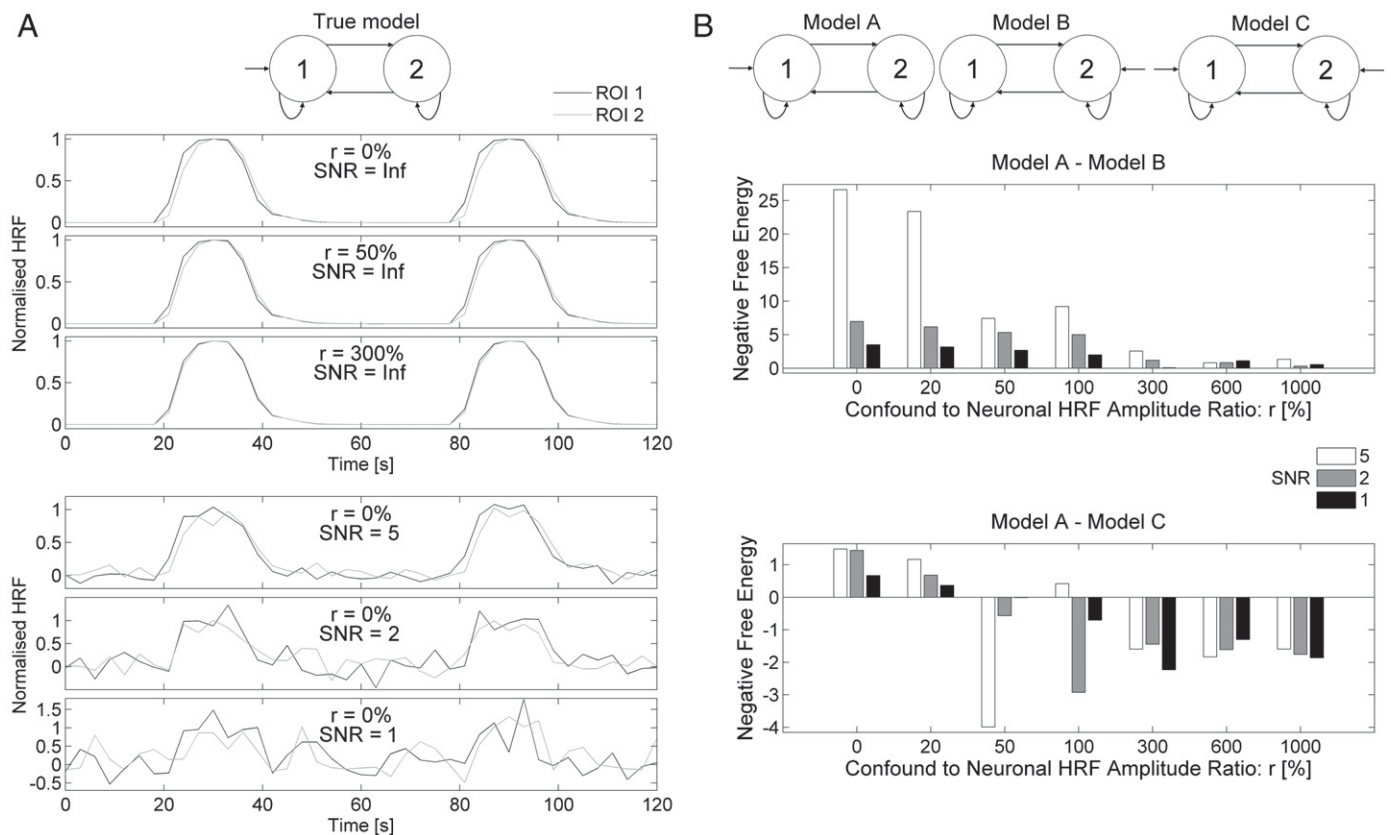


Fig. 2. Simulation of Dynamic Causal Modelling with correlated confounds. A: 2 min of generated time series (HRF with amplitude normalised to 1) with the “true” model defined by Eq. (1). The three first panels show different degrees of contamination by confounds (common mode of original time series) defined by different values of parameter r , without random noise (SNR = Inf, i.e. $\sigma = 0$). The three last panels show examples of simulated BOLD time series for the different values of SNR. B: difference of negative free energy (approximate of log model evidence) between Models A and B (top) and Models A and C (bottom), when fitted to data shown in A and averaged over 50 realisations, as a function of parameter r and SNR.

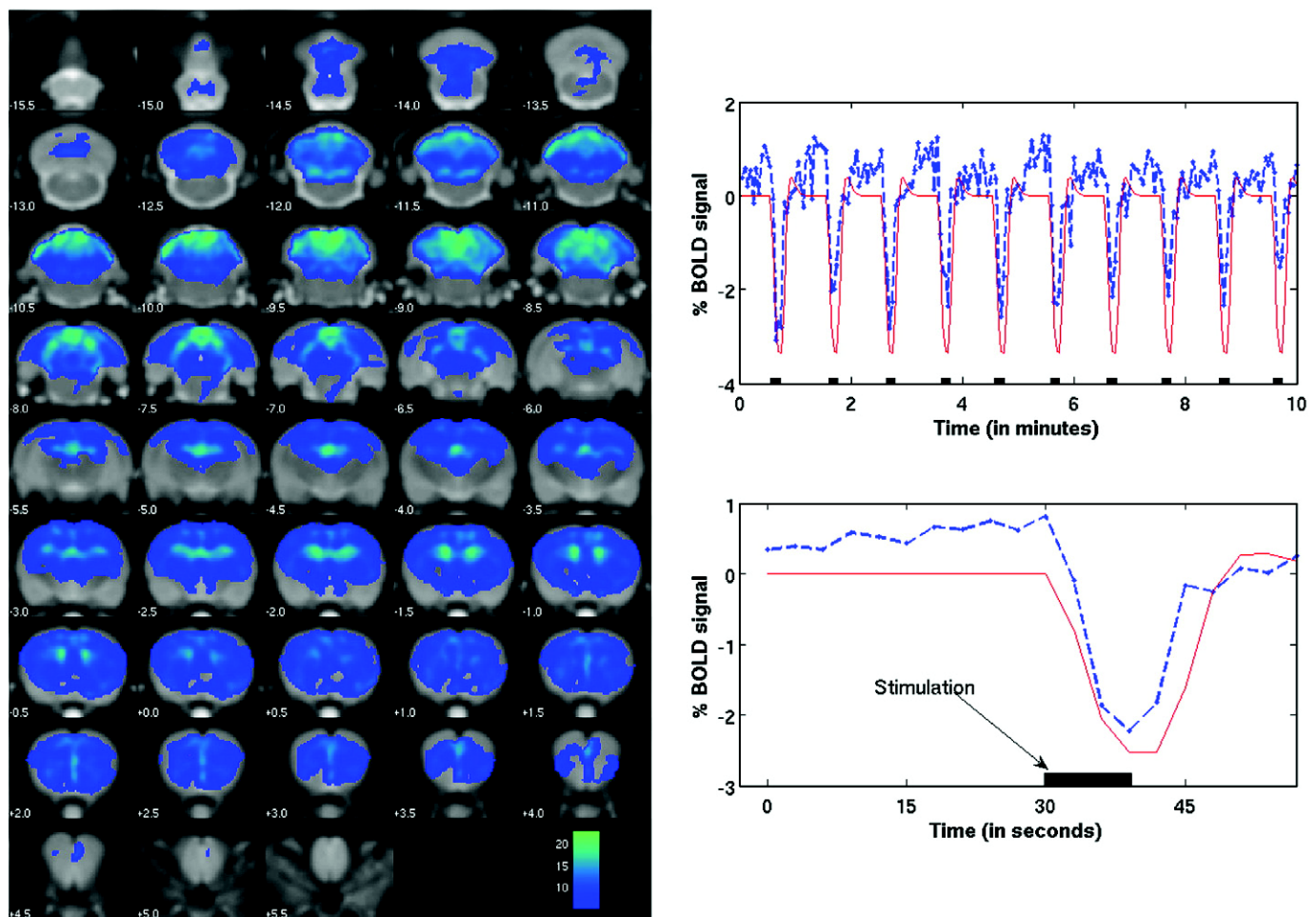


Fig. 3. Deactivations induced by vagal nerve stimulation (group study, $n = 8$). Left: map of negative t -value (thresholded at $p < 0.001$, FWE corrected) showing deactivations. Top right: group average of BOLD signal variations in the NTS (blue) superimposed on the regressor of interest (red) obtained after convolution of the canonical hemodynamic response with the stimulus function (black). Bottom right: average over all stimulations.

fMRI of VNS

Highly significant VNS-related deactivations ($p < 0.001$, FWE corrected) were found at the animal level and at the group level ($n = 8$) (Fig. 3). No significant activations were observed, neither at the group level nor at the animal level. While most of the brain was found to be deactivated at the group level, the strongest deactivations were mainly located in subcortical structures, such as the anterior NTS, the locus coeruleus, the parabrachial nucleus and the vestibular nucleus, in the anterior hippocampus, in the inferior and superior colliculi, or in the cerebellum. The most significant cortical deactivations were found in the retrosplenial, prelimbic, infralimbic, anterior cingulate and agranular insular cortices.

Three rats were removed from DCM analyses because the signal-to-noise ratio was too poor in the predefined ROIs. In the remaining five rats, BOLD time series recorded during stimulation of the intact left VN were well fitted by the different DCMs of Fig. 1. Bayesian model selection was performed at the group level on families of models (Penny et al., 2010) to two test main features (Fig. 4). First (Fig. 4 left), we addressed the identification of the input station of VNS by grouping together the 41 models having the same extrinsic input. We found a clear preference for models receiving vagal afferents on the NTS (FFX posterior probability: $AI = 0$, $CA1 = 0$, $Cg = 0$, $NTS = 1$, $RSG = 0$; RFX exceedance probability: $AI = 0.0003$, $CA1 = 0.0002$, $Cg = 0.1474$, $NTS = 0.8493$, $RSG = 0.0028$). Second (Fig. 4 right), we verified that the DCM approach was capable of detecting the presence of bilateral long range connectivity by comparing

the 210 models with bilateral connections against the 210 other models with forward connections only (FFX posterior probability: unidirectional = 0, bidirectional = 1; RFX exceedance probability: unidirectional = 0, bidirectional = 1). Finally, the most plausible model (Fig. 4 middle) was identified as the one combining those two features, with the fastest spreading from the NTS towards other regions (i.e. direct connections).

Discussion

To our knowledge, the central effects of VNS at a low frequency of stimulation have been rarely explored (Lomarev et al., 2002; Osharina et al., 2006). Here we provided the first fMRI study of acute VNS performed in rodents. Highly significant VNS-related deactivations were found in large portions of the brain, and particularly in the NTS and closely connected structures, such as the parabrachial nucleus, the locus coeruleus and the hippocampus. The VNS-induced fMRI deactivation of the cerebellum was also in agreement with the known anatomical projections of the NTS to the inferior portions of the cerebellum (Xu and Frazier, 1995). Significant deactivations were also reported in the prefrontal cortex and retrosplenial cortex, regions which are known to express c-Fos, a nuclear protein used as a non specific marker of neuronal activation, after continuous 30 Hz VNS (Naritoku et al., 1995).

The observed massive deactivation of the brain is different from reported findings in the only other study of VNS using functional neuroimaging published in rat (Dedeurwaerdere et al., 2005), where glucose metabolism, as measured by FDG-PET, significantly changed

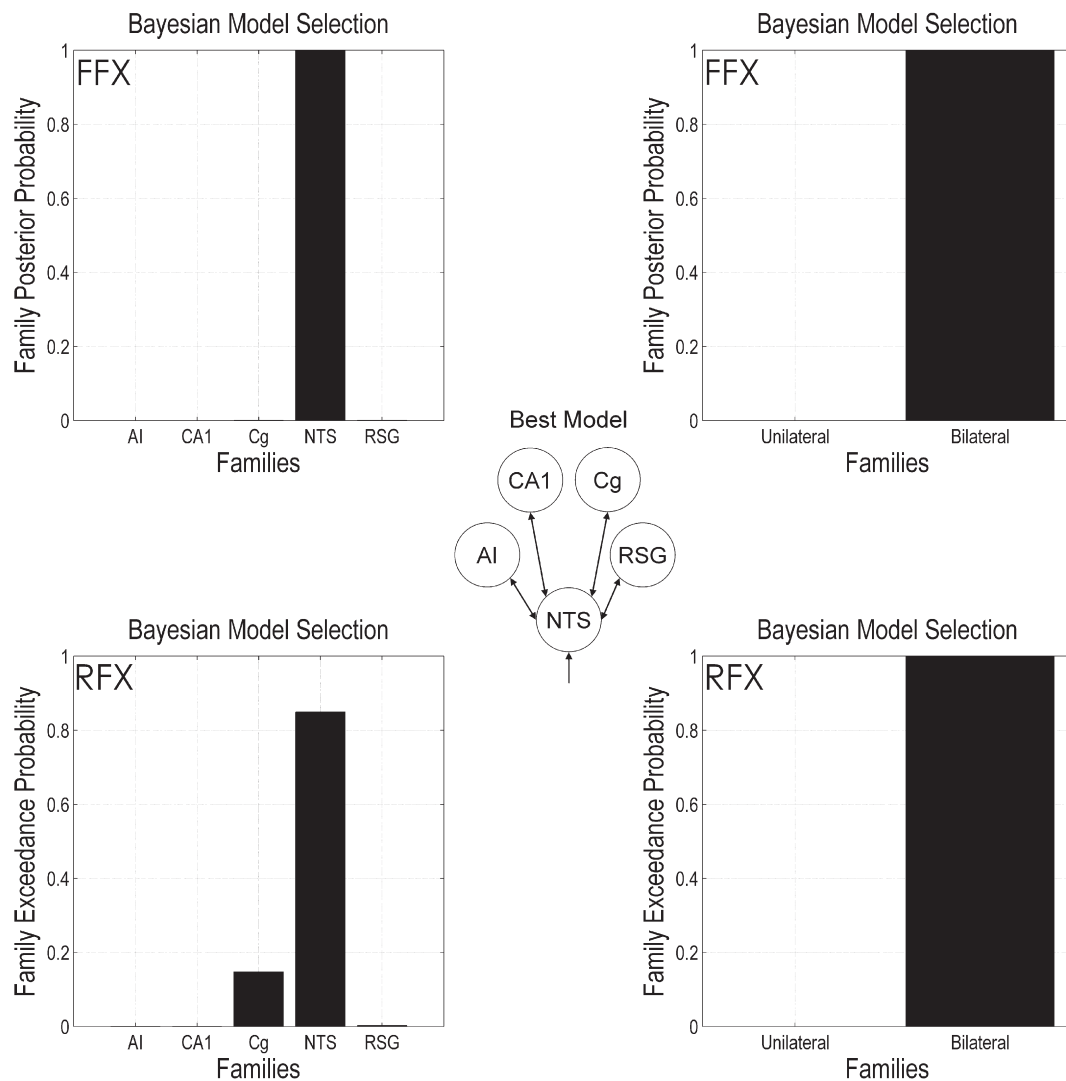


Fig. 4. Group level ($n=5$) Bayesian selection of families of the 410 tested models. Top: fixed-effect analysis (FFX) showing family posterior probability; bottom: random-effect analysis (RFX) showing family exceedance probability. Left: families were constructed to estimate the input station of the VNS (family labels indicate the input structure) and results indicate the NTS as the most likely. Cg comes second and probability is very weak for other scenarios. Right: families grouped together models with unidirectional or bidirectional interregional connectivity. Clear evidence is for the existence of bidirectional long range neuronal connections. Middle: most likely model amongst the 410 tested models.

during acute VNS only in the hippocampus (decrease) and olfactory bulbs (increase). In patient studies of acute VNS, local activations and deactivations were also reported (Bohning et al., 2001; Dietrich et al., 2008; Liu et al., 2003; Lomarev et al., 2002; Nahas et al., 2007; Narayanan et al., 2002; Sucholeiki et al., 2002). The differences between these findings and ours can be explained by several factors, such as diversity in stimulation protocols or in animal preparation. It is also difficult to directly compare results obtained in rats and in humans. In fact, two elements led us to consider a strong cardio-respiratory contribution to these deactivations: (i) deactivation of the brain was concomitant with a transient decrease of heart rate (6% of heart rate decrease measured during 1 h left VNS, see [Supplementary materials](#)); (ii) the most significantly deactivated structures belonged to the central autonomic regulation system (Saper, 2004). Two experimental controls to further understand BOLD statistical maps of acute VNS were performed (see [Supplementary materials](#)): (i) no brain activation was found when the distal end of the vagus nerve (below VN section, i.e. disrupted vagal afferents) was stimulated, whereas brain activations remained unchanged when vagal efferents were disrupted (i.e. stimulation of the proximal end of the vagus nerve, just above VN section). Critically, this series of oriented vagotomy experiments demonstrated a major role taken by afferent fibres in comparison to efferent fibres, and thus

suggested the necessity of the activation of regulation nuclei of the mesencephalon to explain BOLD responses to VNS. (ii) BOLD responses to ephedrine injection showed a significant positive correlation with heart rate changes (ephedrine increases heart rate (Avois et al., 2006)) in many brain regions also deactivated during VNS. VNS and ephedrine results put together, they suggested that the negative sign of BOLD activations during VNS was mainly driven by heart rate decrease.

Because weak bradycardia accompanied VNS, it remained difficult to distinguish neuronal effects and cardio-respiratory effects, which are known to participate significantly to BOLD signals (Birn et al., 2006; Dagli et al., 1999; de Munck et al., 2008; Gray et al., 2009; Wise et al., 2004). DCM as used in this study can be perceived as a way to investigate whether there were neuronal components into measured fMRI signals. Indeed if inferred neuronal connectivity agreed with known neuronal circuitry, i.e. the NTS receives afferent inputs, then an indirect demonstration of the neural nature of measured BOLD signals would have been provided. Model comparison at the group level showed that it was the case since the NTS region was the most likely structure amongst five candidates to receive VNS inputs, in agreement with strong knowledge about neuroanatomical underpinnings of VNS. Moreover, DCM results were reinforced by the fact that we found clear evidence for bilateral long range connectivity, as commonly found in

neuroanatomical studies. The best model at the group level (Fig. 4) indicated fast (i.e. direct) connections from the NTS towards other brain regions. This is very reminiscent of the view of the NTS as a “hub”, or input station to the brain. It also indicates that DCM finds effective connectivity between regions that are not anatomically directly, but probably indirectly, connected. This may be the case for CA1, which is known to receive signals from the NTS, but probably through the amygdala or the locus coeruleus (which were not included in the DCMs and therefore acted as latent variables here).

Along with other electrophysiological validation studies of DCM combined with fMRI (David et al., 2008) or microdialysis recordings (Moran et al., 2008), this new experimental validation of DCM for fMRI is important for two reasons: (i) it is the second demonstration of the ability of DCM for fMRI to estimate neuronal connectivity features in agreement with prior knowledge in rat datasets and thus confirms conclusions derived in (David et al., (2008)); and (ii) it shows that DCM is able to recover the presumed neural input region in the presence of physiological noise. This may be because the state equations of the hemodynamic model are well suited to fit smooth physiological responses and that priors on hemodynamic parameters are sufficiently relaxed to allow them to do so, i.e. to capture neural or indirect hemodynamic variability (David et al., 2008; Friston, 2009; Roebroeck et al., 2009).

To further illustrate this point, we performed a short simulation on a toy model composed of two interconnected regions where a hemodynamic confound modelling task-related physiological responses was assumed to be symmetrically correlated to the neurally induced hemodynamic activity of each region (Fig. 2). The evidence of DCMs was obviously sensitive to the presence of correlated confounds. However, it was possible to detect the true model as being the most plausible model having generating the data when the models used distinct extrinsic inputs (Models A & B). The limit of significance was nonetheless reached for strong correlated confounds ($r > 300\%$), for different degrees of uncorrelated random noise (experimental or physiological). When the models shared common inputs (and probably extrinsic inputs that bypass true intrinsic connectivity such as in Model C), DCM was not able to differentiate models from average log evidence, for any noise level. This interesting result is reassuring for DCM analyses in fMRI, in general, as long as the location of extrinsic inputs is well motivated on the basis of strong anatomical knowledge of brain afferents. However, in other configurations, such as asymmetric confounds, additive experimental noise or more complex DCM architectures with potential interactions between intrinsic (i.e. between brain regions) and extrinsic (e.g. stimuli) connectivity, this ideal scenario could potentially be challenged and reversed.

Robustness of DCM in the presence of physiological responses as demonstrated here may not be true for all studies. Indeed, psychophysiological measurements, such as cardiac, vascular, respiratory, electrodermal, gastrointestinal, and papillary monitoring, may reveal subtle processes during brain–body interactions that are modulated by the experimental context, e.g. emotion or arousal level (Gray et al., 2009). Because DCM aims at revealing changes of neural connectivity associated to differential contextual responses, changes in physiological responses may be wrongly interpreted as changes in neuronal weights in the absence of an adapted generative model of brain–body interactions. Developing such models may be very important for future fMRI studies completed by parallel physiological monitoring to ascertain the validity of a neuronal interpretation of BOLD activation maps. This task is exciting but very complex and was well beyond the scope of this paper. Hopefully, fMRI modellers would soon come up with a solution to this problem.

Acknowledgments

We thank Cyberonics France for providing us with the VNS electrodes. This study was funded by Inserm and Agence Nationale pour la Recherche. The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.neuroimage.2010.05.021.

References

- Avois, L., Robinson, N., Saudan, C., Baume, N., Mangin, P., Saugy, M., 2006. Central nervous system stimulants and sport practice. *Br. J. Sports Med.* 40 (Suppl 1), i16–i20.
- Ben Menachem, E., 2002. Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy. *Lancet Neurol.* 1, 477–482.
- Ben-Menachem, E., Hamberger, A., Hedner, T., Hammond, E.J., Uthman, B.M., Slater, J., Treig, T., Stefan, H., Ramsay, R.E., Wernicke, J.F., et al., 1995. Effects of vagus nerve stimulation on amino acids and other metabolites in the CSF of patients with partial seizures. *Epilepsy Res.* 20, 221–227.
- Bernik, T.R., Friedman, S.G., Ochari, M., DiRaimo, R., Susarla, S., Czura, C.J., Tracey, K.J., 2002. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J. Vasc. Surg.* 36, 1231–1236.
- Biraben, A., Guerin, S., Bobillier, E., Val-Laillet, D., Malbert, C.-H., 2008. Central activation after chronic vagus nerve stimulation in pigs: contribution of functional imaging. *Bull. Acad. Vét. France* 161, 441–448.
- Birn, R.M., Diamond, J.B., Smith, M.A., Bandettini, P.A., 2006. Separating respiratory-variation-related fluctuations from neuronal-activity-related fluctuations in fMRI. *Neuroimage* 31, 1536–1548.
- Bohning, D.E., Lomarev, M.P., Denslow, S., Nahas, Z., Shastri, A., George, M.S., 2001. Feasibility of vagus nerve stimulation-synchronized blood oxygenation level-dependent functional MRI. *Invest. Radiol.* 36, 470–479.
- Bonaz, B., 2007. The cholinergic anti-inflammatory pathway and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 133, 1370–1373.
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458–462.
- Cechetto, D.F., Shoemaker, J.K., 2009. Functional neuroanatomy of autonomic regulation. *Neuroimage* 47, 795–803.
- Chae, J.H., Nahas, Z., Lomarev, M., Denslow, S., Lorberbaum, J.P., Bohning, D.E., George, M.S., 2003. A review of functional neuroimaging studies of vagus nerve stimulation (VNS). *J. Psychiatr. Res.* 37, 443–455.
- Dagli, M.S., Ingeholm, J.E., Haxby, J.V., 1999. Localization of cardiac-induced signal change in fMRI. *Neuroimage* 9, 407–415.
- David, O., Guillemain, I., Saittel, S., Reyt, S., Deransart, C., Segebarth, C., Depaulis, A., 2008. Identifying neural drivers with functional MRI: an electrophysiological validation. *PLoS Biol.* 6, 2683–2697.
- de Munck, J.C., Gonçalves, S.I., Faes, T.J., Kuijper, J.P., Pouwels, P.J., Heethaar, R.M., Lopes da Silva, F.H., 2008. A study of the brain's resting state based on alpha band power, heart rate and fMRI. *Neuroimage* 42, 112–121.
- Dedeuwaerdere, S., Cornelissen, B., Van Laere, K., Vonck, K., Achten, E., Slegers, G., Boon, P., 2005. Small animal positron emission tomography during vagus nerve stimulation in rats: a pilot study. *Epilepsy Res.* 67, 133–141.
- Dietrich, S., Smith, J., Scherzinger, C., Hofmann-Preiss, K., Freitag, T., Eisenkolb, A., Ringler, R., 2008. A novel transcutaneous vagus nerve stimulation leads to brainstem and cerebral activations measured by functional MRI. *Biomed. Tech. (Berl.)* 53, 104–111.
- Dorr, A.E., Debonnel, G., 2006. Effect of vagus nerve stimulation on serotonergic and noradrenergic transmission. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 890–898.
- Fairhall, S.L., Ishai, A., 2007. Effective connectivity within the distributed cortical network for face perception. *Cereb. Cortex* 17, 2400–2406.
- Friston, K., 2009. Dynamic causal modeling and Granger causality Comments on: the identification of interacting networks in the brain using fMRI: model selection, causality and deconvolution. *Neuroimage*. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.09.031.
- Friston, K.J., Holmes, A.P., Worsley, K.J., 1999. How many subjects constitute a study? *Neuroimage* 10, 1–5.
- Friston, K.J., Mechelli, A., Turner, R., Price, C.J., 2000. Nonlinear responses in fMRI: the Balloon model, Volterra kernels, and other hemodynamics. *Neuroimage* 12, 466–477.
- Friston, K.J., Harrison, L., Penny, W., 2003. Dynamic causal modelling. *Neuroimage* 19, 1273–1302.
- Friston, K.J., Stephan, K.E., Lund, T.E., Morcom, A., Kiebel, S., 2005. Mixed-effects and fMRI studies. *Neuroimage* 24, 244–252.
- Friston, K., Mattout, J., Trujillo-Barreto, N., Ashburner, J., Penny, W., 2007. Variational free energy and the Laplace approximation. *Neuroimage* 34, 220–234.
- Garrido, M.I., Kilner, J.M., Kiebel, S.J., Stephan, K.E., Friston, K.J., 2007. Dynamic causal modelling of evoked potentials: a reproducibility study. *Neuroimage* 36, 571–580.
- Gray, M.A., Minati, L., Harrison, N.A., Gianaros, P.J., Napadow, V., Critchley, H.D., 2009. Physiological recordings: basic concepts and implementation during functional magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 47, 1105–1115.
- Groves, D.A., Bowman, E.M., Brown, V.J., 2005. Recordings from the rat locus coeruleus during acute vagal nerve stimulation in the anaesthetised rat. *Neurosci. Lett.* 379, 174–179.
- Guo, S., Seth, A.K., Kendrick, K.M., Zhou, C., Feng, J., 2008. Partial Granger causality—eliminating exogenous inputs and latent variables. *J. Neurosci. Methods* 172, 79–93.
- Hamberger, A., Haglid, K., Nystrom, B., Silfvenius, H., 1993. Co-variation of free amino acids in human epileptogenic cortex. *Neurochem. Res.* 18, 519–525.
- Krahl, S.E., Clark, K.B., Smith, D.C., Browning, R.A., 1998. Locus coeruleus lesions suppress the seizure-attenuating effects of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* 39, 709–714.
- Liu, W.C., Mosier, K., Kalnin, A.J., Marks, D., 2003. BOLD fMRI activation induced by vagus nerve stimulation in seizure patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 811–813.

- Lomarev, M., Denslow, S., Nahas, Z., Chae, J.H., George, M.S., Bohning, D.E., 2002. Vagus nerve stimulation (VNS) synchronized BOLD fMRI suggests that VNS in depressed adults has frequency/dose dependent effects. *J. Psychiatr. Res.* 36, 219–227.
- Marangell, L.B., Martinez, M., Jurdi, R.A., Zboyan, H., 2007. Neurostimulation therapies in depression: a review of new modalities. *Acta Psychiatr. Scand.* 116, 174–181.
- Marrosu, F., Santoni, F., Puligheddu, M., Barberini, L., Maleci, A., Ennas, F., Mascia, M., Zanetti, G., Tuveri, A., Biggio, G., 2005. Increase in 20–50 Hz (gamma frequencies) power spectrum and synchronization after chronic vagal nerve stimulation. *Clin. Neurophysiol.* 116, 2026–2036.
- Mechelli, A., Crinion, J.T., Long, S., Friston, K.J., Lambon Ralph, M.A., Patterson, K., McClelland, J.L., Price, C.J., 2005. Dissociating reading processes on the basis of neuronal interactions. *J. Cogn. Neurosci.* 17, 1753–1765.
- Milby, A.H., Halpern, C.H., Baltuch, G.H., 2008. Vagus nerve stimulation for epilepsy and depression. *Neurotherapeutics* 5, 75–85.
- Moran, R.J., Stephan, K.E., Kiebel, S.J., Rombach, N., O'Connor, W.T., Murphy, K.J., Reilly, R.B., Friston, K.J., 2008. Bayesian estimation of synaptic physiology from the spectral responses of neural masses. *Neuroimage* 42, 272–284.
- Nahas, Z., Teneback, C., Chae, J.H., Mu, Q., Molnar, C., Kozel, F.A., Walker, J., Anderson, B., Koola, J., Kose, S., Lomarev, M., Bohning, D.E., George, M.S., 2007. Serial vagus nerve stimulation functional MRI in treatment-resistant depression. *Neuropsychopharmacology* 32, 1649–1660.
- Narayanan, J.T., Watts, R., Haddad, N., Labar, D.R., Li, P.M., Filippi, C.G., 2002. Cerebral activation during vagus nerve stimulation: a functional MR study. *Epilepsia* 43, 1509–1514.
- Naritoku, D.K., Terry, W.J., Helfert, R.H., 1995. Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res.* 22, 53–62.
- Osharina, V., Bagaev, V., Wallois, F., Larnicol, N., 2006. Autonomic response and Fos expression in the NTS following intermittent vagal stimulation: importance of pulse frequency. *Auton. Neurosci.* 126–127, 72–80.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Inc., San Diego.
- Penny, W.D., Stephan, K.E., Mechelli, A., Friston, K.J., 2004. Comparing dynamic causal models. *Neuroimage* 22, 1157–1172.
- Penny, W.D., Stephan, K.E., Daunizeau, J., Rosa, M.J., Friston, K.J., Schofield, T.M., Leff, A.P., 2010. Comparing families of dynamic causal models. *PLoS Comput. Biol.* 6, e1000709.
- Roebroeck, A., Formisano, E., Goebel, R., 2009. The identification of interacting networks in the brain using fMRI: model selection, causality and deconvolution. *Neuroimage*. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.09.036.
- Saper, C.B., 2002. The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 433–469.
- Saper, C.B., 2004. Central autonomic system. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 761–796.
- Schuyler, B., Ollinger, J.M., Oakes, T.R., Johnstone, T., Davidson, R.J., 2009. Dynamic causal modeling applied to fMRI data shows high reliability. *Neuroimage* 49 (1), 603–611.
- Schweinhart, P., Fransson, P., Olson, L., Spenger, C., Andersson, J.L., 2003. A template for spatial normalisation of MR images of the rat brain. *J. Neurosci. Methods* 129, 105–113.
- Siman-Tov, T., Mendelsohn, A., Schonberg, T., Avidan, G., Podlipsky, I., Pessoa, L., Gadoth, N., Ungerleider, L.G., Hendler, T., 2007. Bihemispheric leftward bias in a visuospatial attention-related network. *J. Neurosci.* 27, 11271–11278.
- Stephan, K.E., Penny, W.D., Daunizeau, J., Moran, R.J., Friston, K.J., 2009. Bayesian model selection for group studies. *Neuroimage* 46, 1004–1017.
- Sucholeiki, R., Alsaadi, T.M., Morris III, G.L., Ulmer, J.L., Biswal, B., Mueller, W.M., 2002. fMRI in patients implanted with a vagal nerve stimulator. *Seizure* 11, 157–162.
- Tracey, K.J., 2007. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* 117, 289–296.
- Tracey, K.J., 2009. Reflex control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 418–428.
- Van Der Zanden, E.P., Boeckxstaens, G.E., de Jonge, W.J., 2009. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 6–17.
- Weber, R., Ramos-Cabrer, P., Wiedermann, D., Van, C.N., Hoehn, M., 2006. A fully noninvasive and robust experimental protocol for longitudinal fMRI studies in the rat. *Neuroimage* 29, 1303–1310.
- Wise, R.G., Ide, K., Poulin, M.J., Tracey, I., 2004. Resting fluctuations in arterial carbon dioxide induce significant low frequency variations in BOLD signal. *Neuroimage* 21, 1652–1664.
- Xu, F., Frazier, D.T., 1995. Medullary respiratory neuronal activity modulated by stimulation of the fastigial nucleus of the cerebellum. *Brain Res.* 705, 53–64.

Dynamic causal modelling and physiological confounds: A functional MRI study of vagus nerve stimulation

Supplementary Materials

SÉBASTIEN REYT ^{1,4,+}, CHLOÉ PICQ ^{2,3,4,+}, VALÉRIE SINNIGER ², DIDIER CLARENÇON ^{2,3}, BRUNO BONAZ ^{2,6}, OLIVIER DAVID ^{1,4,5,*}

1. *Neuroimagerie Fonctionnelle et Métabolique, Inserm, U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France.*
2. *Stress et Interactions Neuro-Digestives (SIND; EA3744), Inserm, U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France.*
3. *Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Antenne de La Tronche, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, France.*
4. *Université Joseph Fourier, Grenoble, France.*
5. *Service de Neuroradiologie et Unité IRM, University Hospital, Grenoble, France*
6. *Clinique Universitaire d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France"*

Introduction

We provide in these Supplementary Materials results of experimental controls performed to evaluate the physiological origins of the BOLD activations measured during acute 5 Hz VNS in Sprague-Dawley rats, as presented in the main text:

- Firstly, we evaluated the effects of VNS at 5Hz on heart rate.
- Secondly, because a moderate heart rate modulation might constitute a confound on the BOLD signal of neural origin (Dagli et al., 1999; de Munck et al., 2008), and in order to distinguish between peripheral cardiovascular modulations versus central nervous effects, we used two experimental controls:
 - Vagotomy above the electrode allowing stimulation of the distal end (VN efferents) or below the electrode for stimulation of the proximal end (VN afferents) was performed;
 - Pharmacological activation of the cardiovascular system with intravenous injection of ephedrine as a vasopressor was used to evaluate the sign of fMRI activations as a function of global blood pressure changes.

We concluded that 5Hz VNS mostly activates the central autonomic regulation system and that fMRI signals obtained during acute 5 Hz VNS are likely to represent both direct and indirect vascular responses to such activation. Interestingly however, though blood pressure changes may constitute a major physiological confound in this dataset, model comparison of DCMs still allowed the identification of the NTS as the input nucleus of the VNS pathway to the brain (see main text).

II Materials and Methods

As in main text, except:

- **VNS surgery:** In rats undergoing vagotomy, the VN was cut just above the electrode (n=2), in order to stimulate efferences, or below (n=2) the electrode to stimulate afferences.
- **Heart rate modulation by VNS:** Heart rate modulation by VNS was quantified prior to MR acquisitions. During this first series of experiments, animals were maintained under 2% isoflurane. Temperature was monitored using a rectal probe and maintained at 37°C using a heating blanket (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard, USA). Oxygen saturation was also monitored using an optical probe (Nonnin, France) located on the hind paw. Electrocardiogram (ECG) was recorded using 3 electrodes connected to an amplifier (ECG 100C, Biopac MP150, 2kHz sampling rate). Rats were continuously stimulated during 1 hour (n=6).
- **FMRI paradigm during ephedrine injection:** Same MR parameters as in main text. The experimental paradigm specific for ephedrine injection: after about 5 minutes of baseline sampling (100 TR), a bolus of ephedrine (0.05 mL) was injected intravenously in the tail vein. BOLD signal was sampled for 5 more minutes (Figure 1B). For those experiments, ECG was recorded in two rats only using a MR-compatible EEG amplifier (1024Hz sampling rate, SD-MRI 32, Micromed, Treviso, Italy) and two copper leads connected to the left forelimb and the right hindlimb.
- **FMRI data analyses:** as in main text, except:
 - Ephedrine cutoff for drift correction (preprocessing): 1/1028s.
 - For data obtained during ephedrine injection, the regressor was either the heart rate estimated from the ECG recorded simultaneously to fMRI, or a Heaviside step function modeling baseline and increased heart rate when recording of ECG was unavailable. Heart rate estimation was done by (i) high-pass filtering the ECG above 120Hz, (ii) detecting QRS peaks in between

gradient artefacts (instantaneous heart rate is the inverse of the time interval between two adjacent QRS peaks), (iii) using a moving average (15s width) of instantaneous heart rate to get a smooth reconstruction. Temporal coregistration of ECG and fMRI was achieved by the means of a TTL trigger delivered by the MR scanner to the ECG amplifier at the beginning of each EPI volume acquisition.

III Results

III.1 Modulation of heart rate by VNS

When 5Hz left VNS was continuously performed for 1 hour (n=5), a non significant decrease (6%, $p>0.05$, Wilcoxon test) of heart rate was observed during the first 7 minutes of stimulation. This decrease was significant (11%; $p<0.05$) after one hour of stimulation. When VNS of the right VN was performed (n=1), the induced bradycardia was more important (19%). These findings advocated for the stimulation of the left (instead of right) VN during short periods (9s) for studying VNS in fMRI with minimal confounding effect of VNS-induced heart rate changes.

III.2 fMRI of VNS

When the left VN was cut above the electrode, stimulation of distal ends of the nerve (n=2) did not induce any significant variations either in BOLD signal or in cardiac and respiratory activities, as compared to non-vagotomised rats. Conversely, when the left VN was cut under the electrode, stimulation of proximal VN ending (n=2), brain activation maps and other physiological measures were similar to those obtained in non-vagotomised rats (Figure S1).

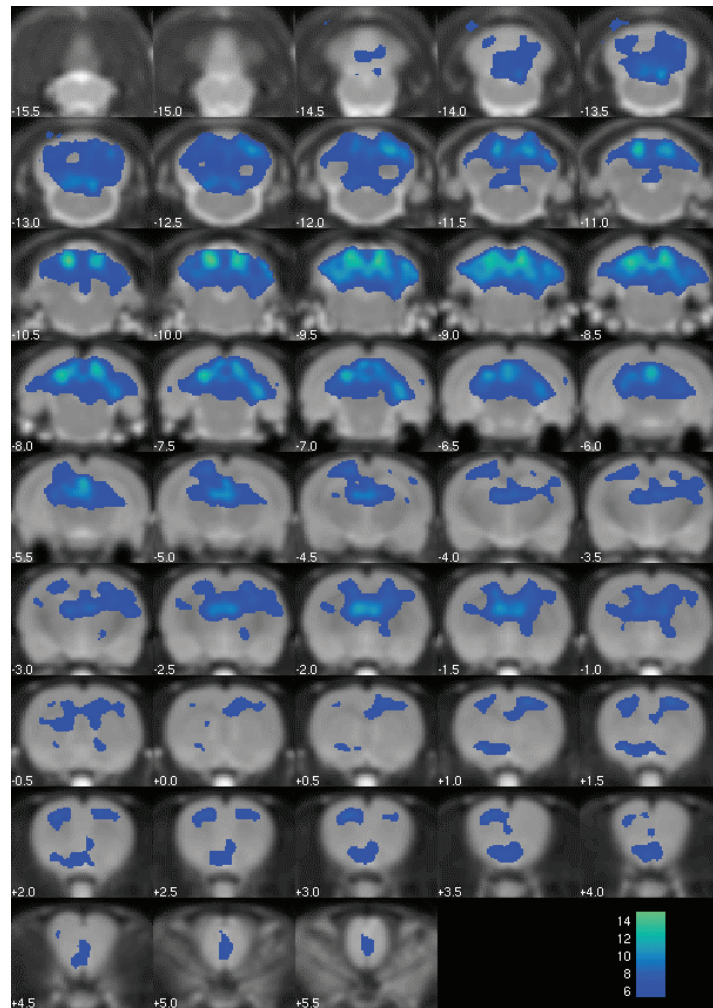


Figure S1: Deactivations induced by stimulation of the proximal end of the vagal nerve (above the section) (group study, $n=2$, thresholded t -map at $p<0.001$ FWE corrected).

III.3 fMRI of heart rate changes induced by ephedrine

A heart rate increase of about 20% of baseline level was observed between one and two minutes after ephedrine injection. Heart rate response slowly decreased afterwards to reach a value of about 10% of baseline level at the end of fMRI scans (*i.e.* 5 minutes after injection) (Figure S2). No strong respiratory effects were detected due to ephedrine injection. Heart rate increase was significantly correlated with widespread BOLD activations, mainly located in the locus coeruleus, the PAG, the cerebellum, the thalamus, and the insular and cingulate cortices.

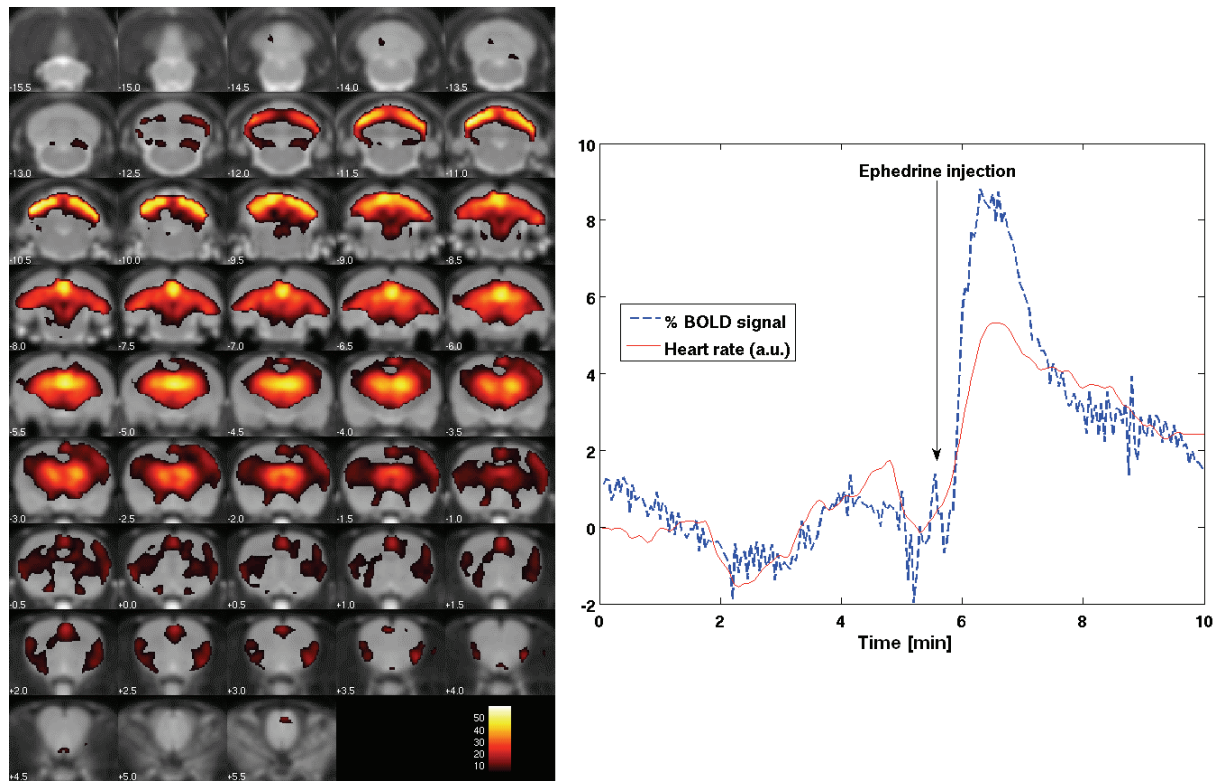


Figure S2: Activations induced by intravenous ephedrine injection. Left: Thresholded t-map showing group activations ($n=7$, $p<0.001$ FWE corrected). Right: Time course of variations of heart rate (red) and BOLD signal averaged over all activated brain voxels (blue), for one rat.

Note the excellent correlation between both variables.

III.3 Superposition of fMRI activation maps

Figure S3 shows at the group level a superposition of the different types of activations (intact VNS, ascending VNS and ephedrine injection). Overlap of BOLD activations between those conditions was important. However, VNS-specific deactivations remained detectable in the superior medulla (NTS region), in the anterior part of the septum, in the anterior motor cortex, and in the posterior and basal cerebellum.

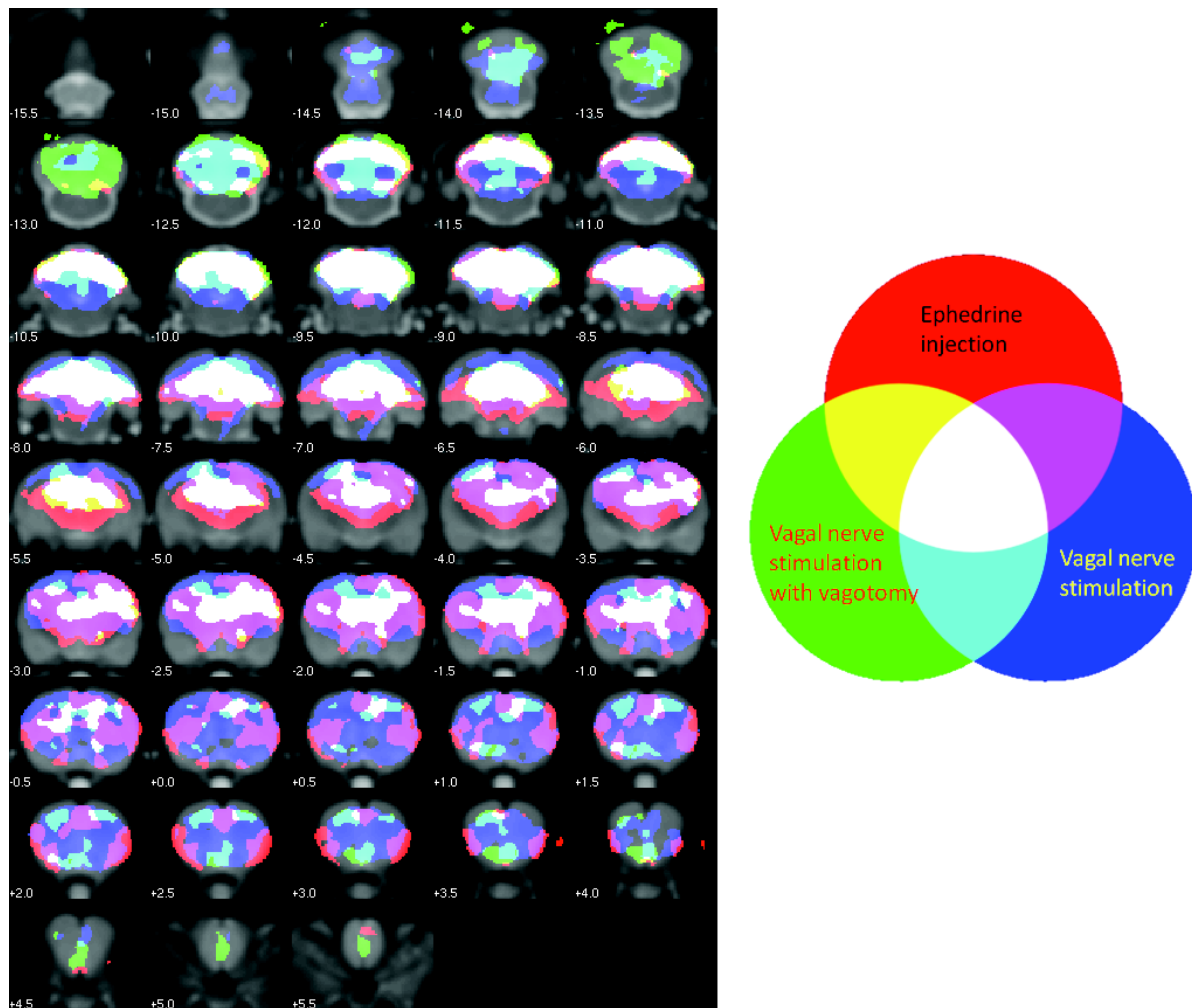


Figure S3: Overlap of activation maps. Binary maps were obtained from the t-maps ($p < 0.001$, FWE corrected) and the superimposition of the different conditions was coded in true colours. VNS-specific deactivations shows up in blue (intact VNS) or green (vagotomised VNS), in cyan for both conditions (most robust VNS-related activations).

IV Discussion

When heart rate was experimentally increased using intravenous injection of ephedrine, we found BOLD activations only, in opposition to VNS. Main BOLD activations found after ephedrine injection were localised in the PAG, thalamus, cerebellum, hippocampus, insula and cingulate cortex. Most of these structures belong to the central

autonomic system (Saper, 2004), to the serotonin system (Harding et al., 2004) and to the noradrenergic system (Aston-Jones, 2004), and agree with the notion of an autonomic brain activation. Ephedrine is a mixed sympathomimetic agent which acts as a stimulant of the central nervous system by enhancing the release of noradrenaline from sympathetic neurones. In turn, the sympathetic neurones stimulate alpha and beta receptors of the heart. Ephedrine not only activates the heart rate, but also causes peripheral constriction, resulting in an increase in peripheral resistance which leads to a sustained rise in blood pressure (Avois et al., 2006). It is thus highly plausible that BOLD activations may also largely reflect increase in blood pressure. Indeed, taken together, the covariation of the sign of BOLD effects and of heart rate modulation after VNS and ephedrine injection suggests that it is entirely plausible that an important ratio of fMRI correlates observed during VNS represent indirect physiological responses.

VNS performed in vagotomised animals finally allowed us to determine that the primary cause of the physiological responses measured in fMRI was the activation of brainstem nuclei involved in the central autonomic regulation system, and not the activation of cardiac receptors to VNS. No brain activation was indeed observed after removing VN afferents. This result also suggests a major role taken by afferent fibres in comparison to efferent fibres during VNS because hemodynamic changes necessitated the activation of regulation nuclei of the mesencephalon which appeared to be specifically deactivated by VNS when overlapping the different experimental conditions (Figure S3).

References

- Aston-Jones, G., 2004. Locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In: Paxinos, G. (Ed.), The rat nervous system. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 259-294.
- Avois, L., Robinson, N., Saudan, C., Baume, N., Mangin, P., Saugy, M., 2006. Central nervous system stimulants and sport practice. *Br J Sports Med* 40 Suppl 1, i16-20.
- Dagli, M.S., Ingeholm, J.E., Haxby, J.V., 1999. Localization of cardiac-induced signal change in fMRI. *Neuroimage* 9, 407-415.
- de Munck, J.C., Goncalves, S.I., Faes, T.J., Kuijter, J.P., Pouwels, P.J., Heethaar, R.M., Lopes da Silva, F.H., 2008. A study of the brain's resting state based on alpha band power, heart rate and fMRI. *Neuroimage* 42, 112-121.
- Harding, A., Paxinos, G., Halliday, G., 2004. The serotonin and tachykinin systems. In: Paxinos, G. (Ed.), The rat nervous system. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 1205-1256.
- Saper, C.B., 2004. Central autonomic system. In: Paxinos, G. (Ed.), The rat nervous system. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 761-796.

9.6 Conclusion

En conclusion, nous avons pu montrer la présence d'activations neuronales par le biais de l'IRM fonctionnelle, malgré la présence d'une forte composante physiologique corrélée au stimulus. Ceci n'aurait pas été possible sans la DCM.

Encore une fois, nous montrons la puissance de cette méthode, qui permet de pallier la résolution temporelle médiocre de l'IRMf. En effet, même si, en IRMf, nous n'avons accès que de façon indirecte aux activations neuronales, il est possible de détecter des activités beaucoup plus fines que ce que laisse supposer la technique.

Nous montrons ici, pour la deuxième fois, que la DCM peut être appliquée à l'IRMf du rat afin d'estimer des connectivités fonctionnelles, à partir de connaissances neuroanatomiques des réseaux. Ceci confirme l'étude présentée au chapitre 8, David et al. (2008).

La réussite de ces manipulations, c'est-à-dire la capacité des protocoles IRMf développés (imagerie et préparation animale) à détecter non seulement des variations hémodynamiques liées à des modifications cardio-respiratoires, mais aussi des activations neuronales subtiles noyées dans ces variations, promet le succès de son application à la stimulation cérébrale profonde.

Chapitre 10

IRM fonctionnelle de la stimulation cérébrale profonde

10.1 Introduction

Comme nous avons pu l'observer dans les chapitres précédents, la validation des différentes techniques en vue de passer à la stimulation cérébrale profonde (SCP) a été un processus long et périlleux.

Ces manipulations consistent à démontrer la faisabilité de l'IRMf de la SCP au laboratoire, et vu le peu de temps dont je disposais en fin de thèse, j'ai effectué un travail exploratoire à champ large pour diriger d'éventuelles études plus exhaustives : des implantations ont été effectuées dans plusieurs cibles facilement implantables. Pourtant, ces quelques résultats montrent bien la faisabilité de la technique, qui a fait l'objet de très peu d'études chez l'animal (Shyu et al. (2004a,b); Austin et al. (2003); Canals et al. (2008); Logothetis et al. (2010)).

Dans un premier temps seront exposés les différents protocoles mis au point pour l'étude de la SCP par IRMf : chirurgie, mise en place de l'animal, et paramètres de stimulation.¹ Puis, je présenterai les quelques résultats obtenus sur différentes cibles de stimulation.

1. Les paramètres d'imagerie sont les mêmes que pour la stimulation de la patte (cf. 7.2.2).

10.2 Protocole d'implantation des électrodes de stimulation

Le choix des électrodes de stimulation et leur protocole de fabrication ont été détaillés au chapitre 6. Je présente ici le protocole d'implantation chirurgicale de ces électrodes tel qu'il a été effectué pour les manipulations d'IRM fonctionnelle de la stimulation électrique intracérébrale.

Protocole Le protocole ci-dessous est illustré par la figure 10.1 :

- Induction de l'anesthésie par isoflurane (5%) dans une cage à induction.
- Installation de l'animal dans un cadre stéréotaxique sous anesthésie (isoflurane 2%). Maintien par barres d'oreilles et barre à dents. Contrôle de la température corporelle grâce à une couverture chauffante reliée à une sonde rectale de température. (*image A*)
- Tonte du dessus du crâne de l'animal.
- Désinfection du dessus du crâne de l'animal à la povidone iodée.
- Injection sous cutanée de lidocaïne au niveau du champ opératoire.
- Incision longitudinale du scalp et résection du tissu sous cutané. (*images B et C*)
- Repérage des coordonnées stéréotaxiques.² (*images D et E*)
- Trépanations au niveau des deux points d'implantation. (*image F*)
- Implantation d'électrodes de stimulation profonde en carbone.² (*image G*)
- Les électrodes sont fixées individuellement au crâne par de la glu, puis l'ensemble des électrodes est fixé au crâne grâce à du ciment dentaire. (*images H et I*)

A propos du casque en ciment dentaire Des dispositions particulières doivent être prises dans la confection du casque pour l'IRMf de la SCP. L'imagerie est en effet bien meilleure lors de l'utilisation d'une antenne de surface, et cette antenne doit être plaquée au plus près du crâne de l'animal. Le casque nécessaire au maintien des électrodes constituant un obstacle entre le cerveau et l'antenne, celui-ci se doit d'être le plus plat possible, tout en permettant un bon maintien des électrodes.

La confection du casque diffère quelque peu selon que l'animal est destiné à l'examen IRMF sans réveil après la chirurgie, ou qu'il doit attendre quelque jours avant l'IRM. Malheureusement, des casques très plats et fins (comme celui de l'image I de la figure 10.1) permettant une bonne mise en place de l'antenne de réception RMN sont facilement enlevés par des rats éveillés. Pour les résultats présentés ici, l'imagerie a été conduite peu de temps après la chirurgie, sans réveil du rat.

2. Le repérage de la profondeur de l'implantation est effectué grâce à la section de l'électrode à la profondeur voulue. Le cathéter vient alors en butée sur le crâne, indiquant que la profondeur est atteinte.

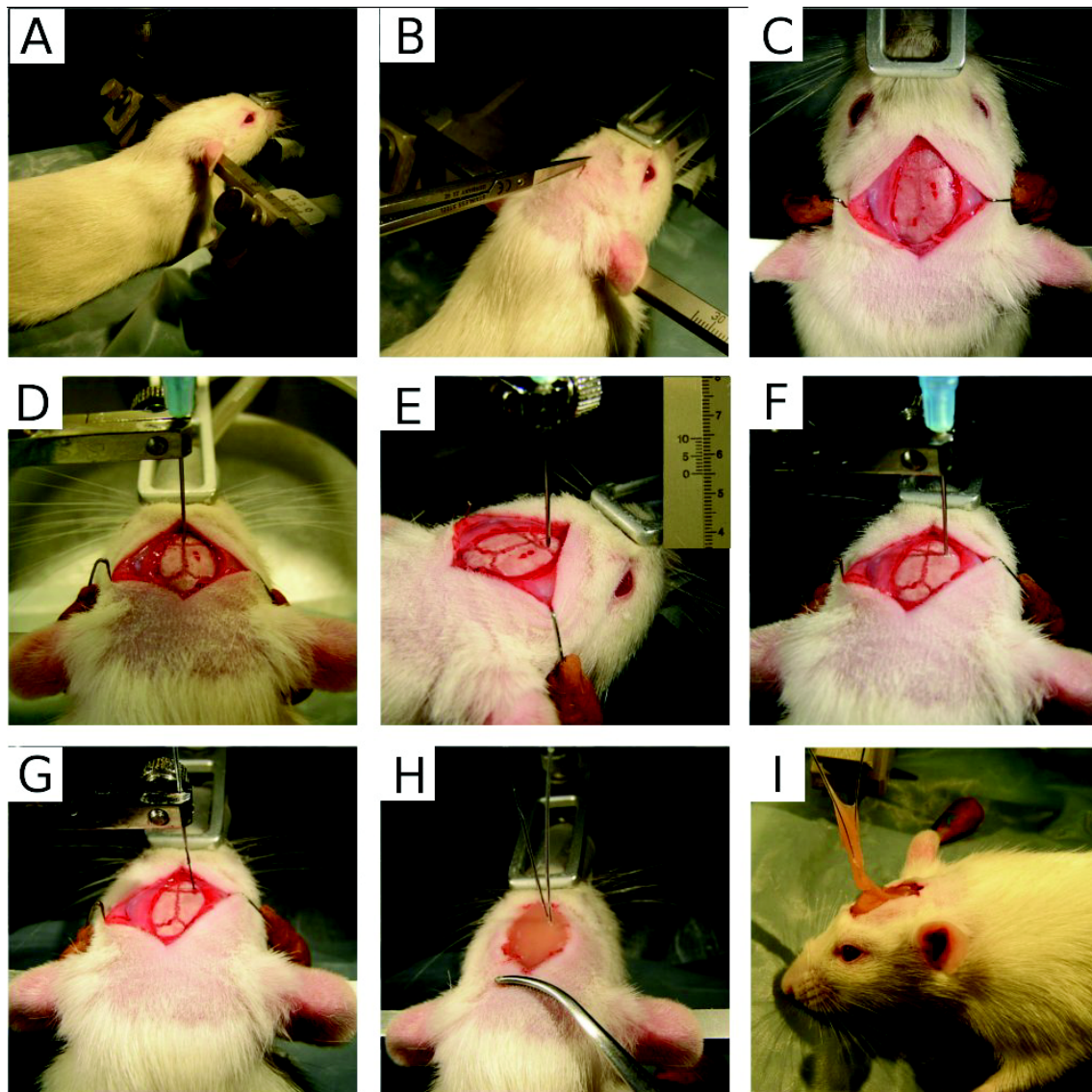


FIGURE 10.1 – Protocole d'implantation d'électrodes intra-cérébrales en vue de l'IRMf d'une stimulation du striatum :

- A Placement du rat sur un cadre stéréotaxique
- B Incision du scalp
- C Résection du tissu sous-cutané et nettoyage au sérum physiologique
- D Repérage du Bregma
- E Repérage du point d'implantation grâce au cadre stéréotaxique et vernier permettant la mesure
- F Trépanation au niveau d'un des points d'implantation
- G Mise en place de l'électrode au point d'implantation
- H Coulée de ciment dentaire afin de sceller les électrodes de stimulation
- I Casque final en ciment dentaire en vue d'un passage à l'IRM sans réveil

10.3 Influence de l'implantation sur l'imagerie

L'imagerie étant effectuée juste après l'implantation, les saignements et hématomes irrémédiablement provoqués par l'insertion des électrodes se traduisent par des artefacts de susceptibilité magnétique, qui entraînent une chute du T_2^* , et donc une baisse significative du signal BOLD.

Sur les images anatomiques ces effets de susceptibilité se font moins sentir, et les images permettent une vérification du lieu d'implantation des électrodes. Par contre, les séquences EPI utilisées pour l'imagerie fonctionnelle sont extrêmement sensibles à la présence de sang, et on voit apparaître de grosses « zones sombres » autour du lieu d'implantation. La figure 10.2 montre un exemple d'images anatomique et EPI correspondant à une implantation dans le gyrus dentelé.

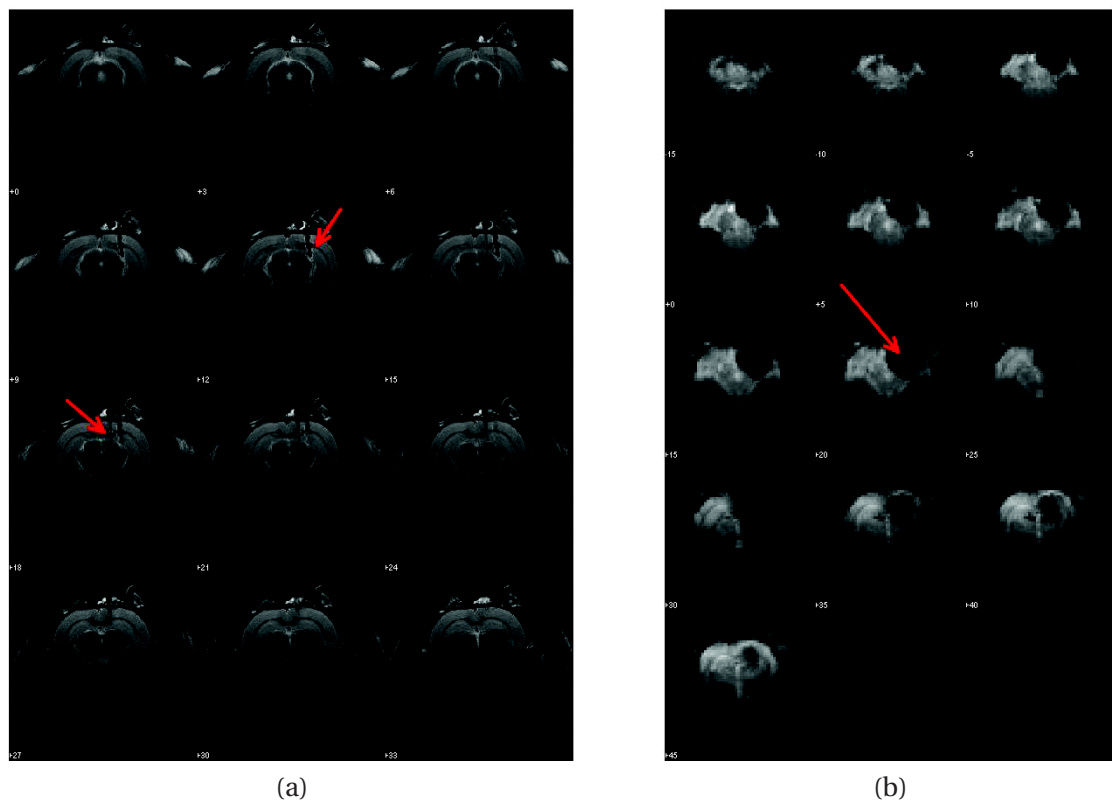


FIGURE 10.2 – Images IRM d'un cerveau de rat impliqué dans le gyrus dentelé.

- (a) Image anatomique : on observe principalement la présence des électrodes (flèches).
- (b) Image fonctionnelle : la présence de sang entraîne une zone sombre empêchant la mesure du signal BOLD (flèches).

10.4 Résultats

Afin de démontrer la faisabilité de la technique d'IRMf de la stimulation électrique intracérébrale, plusieurs cibles ont été stimulées. Dans cette partie je présenterai les résultats correspondants à quatre noyaux stimulés : le noyau géniculé dorso-latéral, le gyrus dentelé, le striatum, et le noyau ventral postérieur du thalamus. Ces noyaux présentent l'avantage d'être facilement atteignables, même avec des électrodes en carbone peu performantes mécaniquement et ne permettant pas une grande précision dans l'implantation.

Comme le temps a manqué pour réaliser une étude sur l'efficacité des paramètres de stimulation, divers paramètres ont été testés, toujours dans une optique d'exploration préliminaire. Les paramètres de stimulation seront donc détaillés pour chaque expérience. Toutefois, pour la plupart d'entre eux, ils ne diffèrent que très peu des paramètres usuellement choisis, par exemple dans le traitement de la maladie de Parkinson.

10.4.1 Stimulation du noyau géniculé dorso-latéral

Contexte La première manipulation en IRMF de la SCP a eu lieu au début de ma thèse sur l'aimant 2,35 T, et a porté sur l'implantation d'un rat dans le noyau géniculé dorso-latéral (DLG).

Anatomie Environ 37 % des fibres issues du nerf optique projettent sur le DLG (Martin (1986)), qui projette lui-même en grande partie dans le cortex visuel primaire. La facilité d'accès du DLG et le caractère univoque de ses projections en a fait une cible de choix pour cette première expérience.

Préparation animale et coordonnées d'implantation L'imagerie s'est déroulée alors que le rat était anesthésié à l'isoflurane léger (1 % environ), et l'implantation a été effectuée avec des électrodes en carbone.

	Antéro-postérieur (AP)	Latéral (L) droite	Profondeur (V)
Première électrode	-4.8	3.8	5.0
Deuxième électrode	-3.8	3.4	4.6

FIGURE 10.3 – Coordonnées théoriques d'implantation d'électrodes en carbone dans le noyau géniculé dorso-latéral, en mm, et par rapport au Bregma.

Résultats Comme le montre la figure 10.4, de très nettes activations ont été observées dans le cortex visuel primaire, ce qui est conforme aux attentes. Toutefois, ces activations sont bilatérales, et amènent à se demander quelles fibres ont été recrutées.

Reproductibilité Malheureusement, cette manipulation s'est avérée impossible à reproduire par la suite, et de longs mois ont passé sans observer aucune activation cérébrale chez le rat, que ce soit en stimulation centrale ou périphérique. Ce sont ces échecs répétés qui ont entraînés la recherche plus poussée des protocoles d'anesthésie et d'implantation présentés aux chapitres précédents³.

3. Depuis, quelques études ont étudié par IRMF les variations de signal BOLD en réponse à des stimuli visuels sous anesthésie à 1% d'isoflurane à 7 T (Lau et al. (2011a,b))

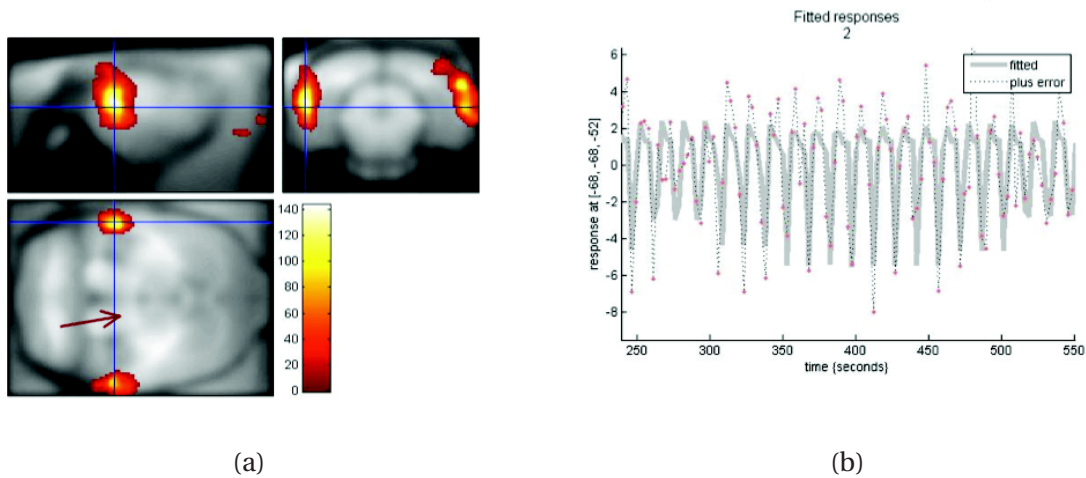


FIGURE 10.4 – Imagerie fonctionnelle à 2,35 T de la stimulation du noyau géniculé dorso-latéral. (a) Activation bilatérale du cortex visuel primaire. La flèche désigne le lieu d'implantation. (b) Décours temporel de la région d'intérêt (en pointillé) et régresseur utilisé (trait plein).

10.4.2 Stimulation du gyrus dentelé

Anatomie Le gyrus dentelé est une structure de l'hippocampe, qui appartient au système limbique, impliqué dans la gestion de la mémoire et des émotions.

Les voies d'entrée du gyrus dentelé comprennent notamment le cortex entorhinal (cf. fig. 10.5) et les noyaux septaux, impliqués dans la gestion de l'olfaction. Le gyrus dentelé projette ensuite ces informations au reste de l'hippocampe.

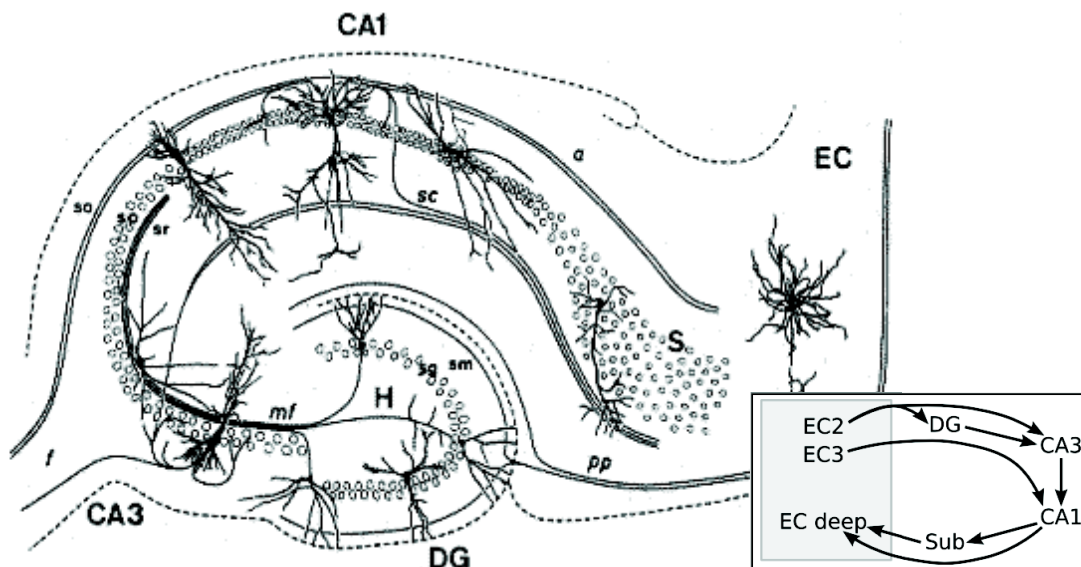


FIGURE 10.5 – Structure interne de l'hippocampe chez le rat et connectivités fonctionnelles
 DG : gyrus dentelé ; CA1/CA3 : corne d'Ammon ; EC : cortex entorhinal ;
 S/Sub : subiculum ; H : hile

D'après ces données, on peut donc s'attendre à activer l'hippocampe ou le cortex entorhinal par stimulation du gyrus dentelé, selon qu'on active les fibres rétrogrades ou antérogrades.

Coordonnées d'implantation Les coordonnées décrites sur la figure 10.6 ont été choisies pour l'implantation de deux électrodes encerclant le gyrus dentelé.

	Antéro-postérieur (AP)	Latéral (L) droite	Profondeur (V)
Première électrode	-6.8	4.0	5.0
Deuxième électrode	-5.3	2.5	4.1

FIGURE 10.6 – Coordonnées théoriques d'implantation d'électrodes en carbone dans le gyrus dentelé, en mm, et par rapport au Bregma.

Paramètres de stimulation Les paramètres de stimulation utilisés lors des résultats présentés figure 10.7 sont :

- Durée du train de stimulation : 30 s (soit 10 images EPI)
- Intensité : 400 μ A
- Durée d'un pulse de stimulation : 500 μ s
- Fréquence de stimulation : 120 Hz

Résultats Sur les figures 10.7 et 10.8, on peut voir les activations significatives en réponse à la stimulation du gyrus dentelé.

Trois régions cérébrales présentent des activations : le cortex entorhinal, une partie des noyaux septaux, et une partie de l'hippocampe. Ceci correspond aux résultats attendus, avec une activation des fibres passant entre les électrodes, à la fois de manière antérograde et rétrograde.

En particulier, on remarque que les activations observées au niveau de l'hippocampe sont limitrophes à la zone sombre, ce qui implique qu'il est possible d'obtenir des activations assez proches du lieu d'implantation.

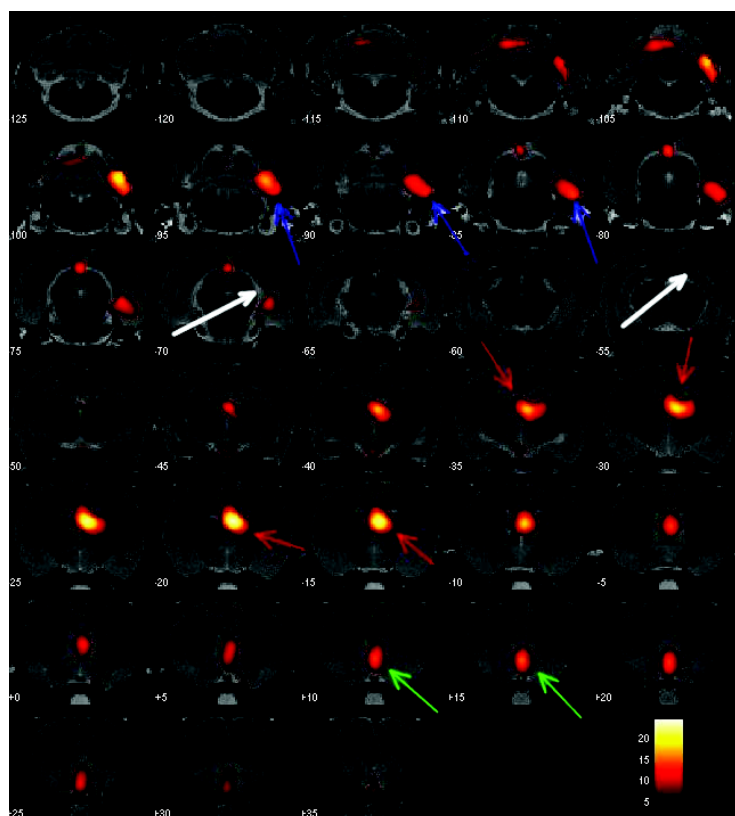


FIGURE 10.7 – Activations observées lors de la stimulation du gyrus dentelé.

(correction FWE; $p < 0.05$)

Les électrodes de stimulation ont été implantées au niveau des flèches blanches, englobant le gyrus dentelé

Activation des noyaux septaux (flèches vertes), d'une partie de l'hippocampe (flèches rouges) et du cortex entorhinal (flèches bleues).

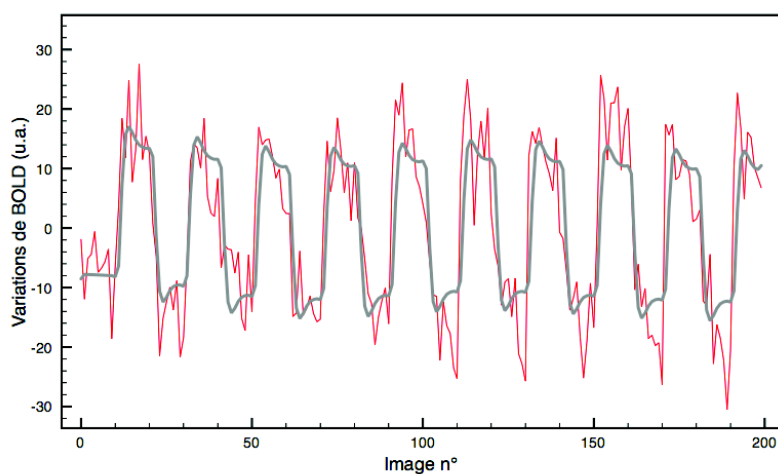


FIGURE 10.8 – Décours temporel d'un voxel activé (en rouge) et régresseur (en gris), lors de la stimulation du gyrus dentelé, moyennés sur 5 sessions EPI.

10.4.3 Stimulation du striatum

Anatomie Le striatum est une structure cérébrale constituée du putamen et du noyau caudé. Ces deux noyaux sont particulièrement riches en fibres, et répondent donc bien à la SCP. Ce sont des structures majeures des ganglions de la base, et elles jouent un rôle primordial dans la gestion de la motricité. Comme le montre la figure 10.9, elles reçoivent des afférences de l'ensemble du cortex, et plus particulièrement du cortex moteur.

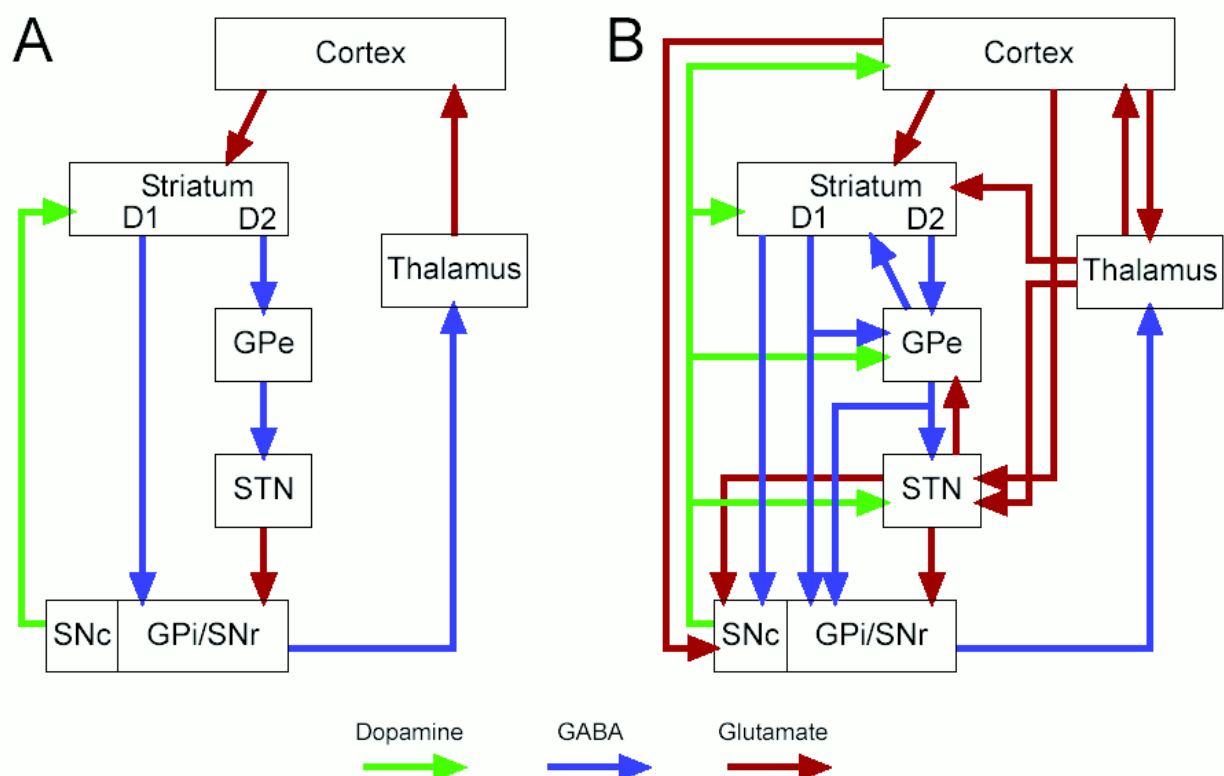


FIGURE 10.9 – (A) Connexions fonctionnelles intrinsèques des ganglions de la base décrites par Albin et al. (1989).

Le striatum reçoit des entrées du cortex cérébral, principalement du cortex moteur. Le thalamus projette principalement sur le cortex somatosensoriel.

(B) Des recherches récentes ont révélé une organisation plus complexe des ganglions de la base.

Légende : GPe : globus pallidus externe ; STN : noyau subthalamique ; GPi : globus pallidus interne ; SNr : substance noire réticulée ; SNc : substance noire compacte.

Coordonnées d'implantation Les coordonnées suivantes ont été choisies pour l'implantation de deux électrodes dans le striatum :

	Antéro-postérieur (AP)	Latéral (L) droite	Profondeur (V)
Première électrode	0.8	1.8	4.8
Deuxième électrode	-1.2	2.0	4.0

FIGURE 10.10 – Coordonnées théoriques d'implantation d'électrodes en carbone dans le striatum, en mm, et par rapport au Bregma.

Paramètres de stimulation Les paramètres de stimulation utilisés lors des résultats présentés figure 10.11 sont :

- Durée du train de stimulation : 30 s (soit 10 images EPI)
- Intensité : 500 μ A
- Durée d'un pulse de stimulation : 500 μ s
- Fréquence de stimulation : 60 Hz

Résultats Les figures 10.11 et 10.12 montrent une forte activation du cortex moteur M1 ipsilatéral à l'électrode, ainsi qu'une activation plus ténue du côté controlatéral.

Cette activation est cohérente avec les connectivités fonctionnelles connues du striatum, et la stimulation va jusqu'à occasionner des événements hémodynamiques dans l'hémisphère controlatéral à l'électrode.

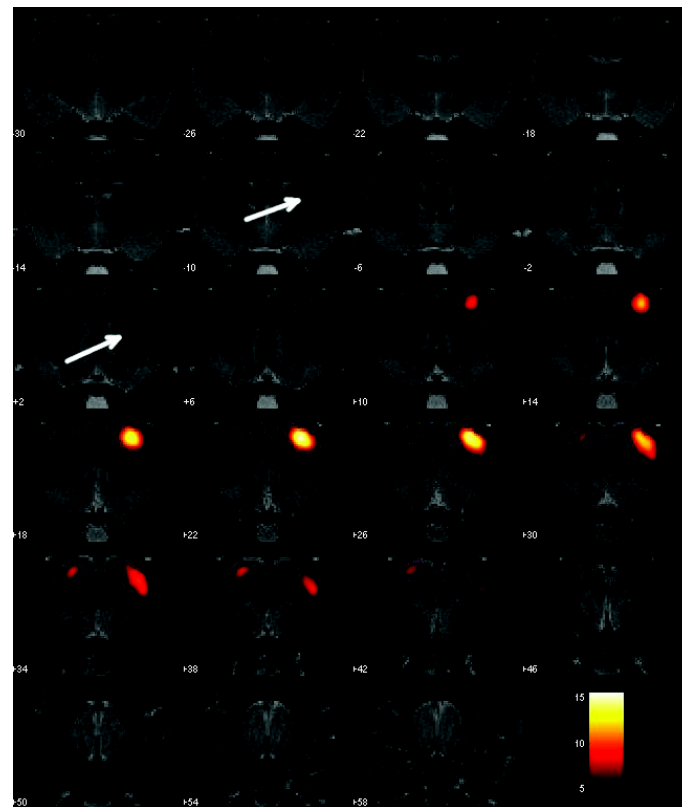


FIGURE 10.11 – Activations du cortex moteur observées lors de la stimulation du striatum (correction FWE ; $p < 0.05$)

Les électrodes ont été implantées au niveau des flèches blanches.

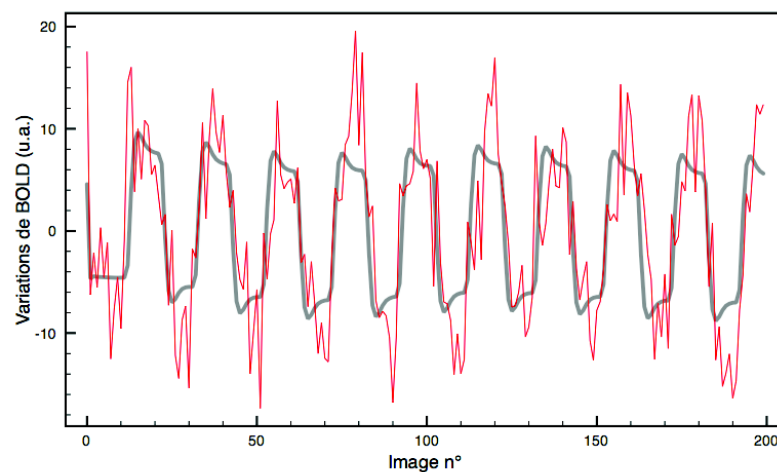


FIGURE 10.12 – Décours temporel d'un voxel activé (en rouge) et régresseur (en gris), lors de la stimulation du striatum, moyennés sur 5 sessions EPI.

10.4.4 Stimulation du noyau ventral postérieur du thalamus

Anatomie Situé en position intermédiaire entre cortex et tronc cérébral, le thalamus a principalement une fonction de relais et d'intégration des afférences sensitives et sensorielles et des efférences motrices, ainsi que de régulation de la conscience, de la vigilance et du sommeil.

Le noyau ventral postérieur du thalamus, quant à lui, reçoit des afférences de différents réseaux de fibres consacrées au transport des informations sensorielles et somesthésiques (cf figure 10.9). Il projette principalement vers le cortex somatosensoriel primaire. Il est principalement constitué de deux sous-noyaux : le noyau ventral postérieur latéral (VPL) et le noyau ventral postérieur médian (VPM). Nous noterons à présent l'ensemble de ces deux sous-structures VPL/VPM.

Coordonnées d'implantation Les coordonnées suivantes ont été choisies pour l'implantation de deux électrodes dans le VPL/VPM :

	Antéro-postérieur (AP)	Latéral (L) droite	Profondeur (V)
Première électrode	-3.0	2.9	5.7
Deuxième électrode	-4.3	3.0	6.0

FIGURE 10.13 – Coordonnées théoriques d'implantation d'électrodes en carbone dans le thalamus, en mm, et par rapport au Bregma.

Paramètres de stimulation Les paramètres de stimulation utilisés lors des résultats présentés ci-dessous sont :

- Durée du train de stimulation : 30 s (soit 10 images EPI)
- Intensité : 300 μ A
- Durée d'un pulse de stimulation : 400 μ s
- Fréquence de stimulation : 60 Hz

Résultats Les figures 10.14 et 10.15 montrent une activation nette et localisée au niveau du cortex somatosensoriel primaire lors de stimulation du VPM/VPL. Dans la mesure où cette zone constitue une efférence du VPM/VPL, ces données montrent encore une fois la faisabilité de l'IRMf de la stimulation électrique intracérébrale.

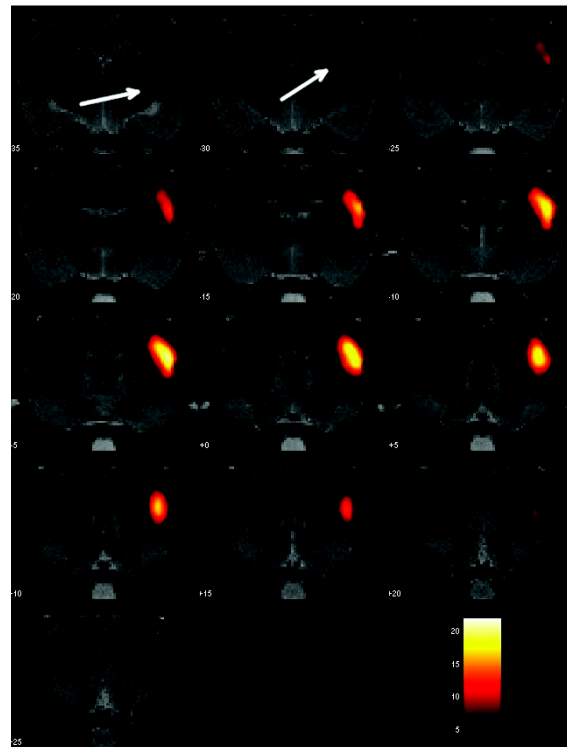


FIGURE 10.14 – Activations observées dans le cortex somatosensoriel primaire lors de la stimulation du noyau ventral postérieur du thalamus. (correction FWE ; $p < 0.05$)
L'implantation a eu lieu au niveau des flèches blanches.

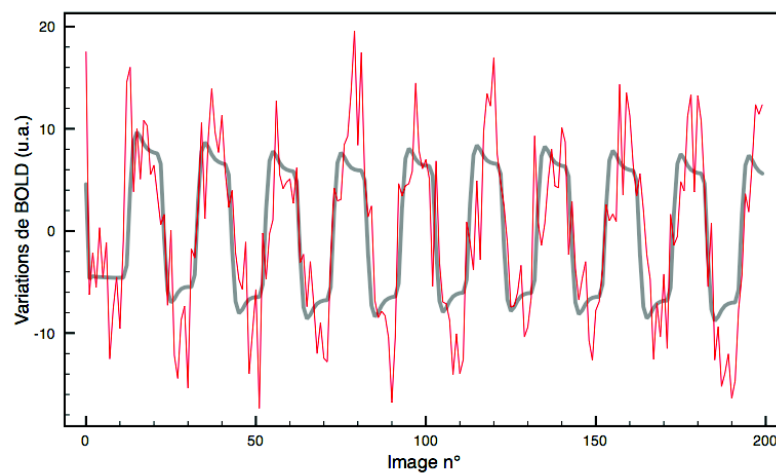


FIGURE 10.15 – Décours temporel d'un voxel activé (en rouge) et régresseur (en gris), lors de la stimulation du thalamus, moyennés sur 6 sessions EPI.

10.5 Perspectives

En conclusion, ces résultats montrent qu'il est possible de détecter par IRMf des activations claires et précises à distance de l'électrode, et ainsi d'étudier les mécanismes *à distance* de la stimulation cérébrale profonde.

Toutefois, ce travail ne permet pas de conclusion définitive, et les questions posées à propos de ces mécanismes, développées en 3.2.2, méritent des études multi-sujets de plus grande envergure. Il faudra, pour ces études, apporter un soin particulier à la reproductibilité de l'implantation, très délicate avec les électrodes en carbone, malgré les outils stéréotaxiques de précision qui ont fait leurs preuves avec des électrodes rigides.

D'autre part, il serait intéressant d'explorer les effets des paramètres de stimulation. En effet, les quelques résultats obtenus suggèrent des comportements tout à fait différents de la stimulation, avec d'importants changements des régions activées ou désactivées, par exemple en fonction de la fréquence de stimulation.

De plus, comme le montre la figure 10.2, l'acquisition de données EPI au niveau du lieu d'implantation s'avère très compliquée, et il reste certainement des améliorations à effectuer pour obtenir des artefacts moins importants autour des électrodes, peut-être en étudiant les possibilités d'imagerie fonctionnelle en écho de spin.

Pour pallier ces problèmes, une piste serait de s'intéresser aux singes, dont la taille du cerveau permettrait une moindre perturbation grâce à des électrodes commerciales compatibles IRM, ainsi qu'une précision et donc une reproductibilité accrues.

Conclusion

Cette thèse a montré la faisabilité de l'imagerie fonctionnelle de la stimulation cérébrale profonde chez le rat. Cependant, la réussite de ces expérimentations est conditionnée par le souci du détail concernant un certain nombre de points, que je vais à présent résumer.

Imagerie

L'avantage de la neuroimagerie par IRM chez le petit animal est indubitablement de pouvoir faire des études sur cerveau entier avec une bonne résolution spatiale, ce qui est bien sûr impossible par les techniques plus classiques d'électrophysiologie. Pourtant, dans la littérature, il est d'usage de ne prendre des images que de quelques coupes de cerveau, comprenant la région d'intérêt, et de faire en sorte que cette région soit au centre de l'aimant. (Adamczak et al. (2010); Austin et al. (2003); Shih et al. (2008))

En effet, se restreindre à n'observer que quelques coupes de cerveau permet de s'affranchir d'un certain nombre de difficultés. Les champs utilisés en IRMf du petit animal étant plus forts que chez l'homme, les séquences d'imagerie rapides sont bien plus contraignantes pour les gradients, et il est plus compliqué d'obtenir un champ homogène sur tout le cerveau. De plus, réduire le nombre de coupes permet de diminuer les temps de répétition, tout en évitant une surchauffe du système de gradients.

Lors de cette thèse, je me suis placé dans un cadre plus général, en observant à chaque expérience le cerveau entier. Ceci a permis d'effectuer des développements méthodologiques de manière globale, notamment dans l'optique d'expérimentations au cours desquelles les activations à observer ne sont pas prédites en amont.

Quant aux types de séquences, seules des séquences EPI ont été utilisées, et c'est généralement ce qui est fait dans la littérature. Certaines équipes utilisent des séquences conventionnelles pondérées en T_2^* (Spenger et al. (2000); Shyu et al. (2004a)) de manière à obtenir des résolutions spatiales plus importantes qu'en EPI, mais le temps nécessaire pour obtenir une image est de l'ordre de la vingtaine de secondes, et ne permet donc pas un suivi satisfaisant des variations de signal BOLD.

Se pose alors la question de l'écho de spin (SE-EPI) ou de l'écho de gradient (GE-EPI). On trouve les deux séquences dans la littérature (Weber et al. (2006); Zhao et al. (2008b)), mais je n'ai pour ma part obtenu de résultats qu'avec des séquences GE-EPI. En effet, si la SE-EPI procure un rapport signal sur bruit généralement meilleur, le contraste en T_2 , et non en T_2^* , induit

des variations de signal BOLD trois fois moins importantes (Stroman et al. (2001)). Toutefois, si l'on souhaite observer les zones sombres dues aux artefacts de susceptibilité magnétique, il devient obligatoire de choisir les séquences en écho de spin, de manière à obtenir du signal dans ces zones.

Le passage à haut champ a ses avantages et ses inconvénients : le rapport signal sur bruit est en théorie plus fort, mais on augmente aussi les artefacts de façon conséquente. Au final, les études se font de 4,7 T à 11,7 T, mais les très hauts champs sont particulièrement utilisés pour l'IRMf de la souris (Nair and Duong (2004); Adamczak et al. (2010)), afin d'obtenir une meilleure résolution spatiale.

Enfin, le choix du temps de répétition et du temps d'écho ne fait pas vraiment débat. On choisit généralement un temps d'écho de l'ordre du T_2^* de la région d'intérêt, en adaptant les autres paramètres d'imagerie (bande passante, position de l'écho dans la fenêtre d'acquisition, multishot, etc.) pour parvenir à cette fin. Quant au temps de répétition, il est généralement pris aux alentours de 2 ou 3 secondes, ce qui permet un bon suivi de la dynamique BOLD, tout en conservant un rapport signal sur bruit satisfaisant.

Anesthésie

On rencontre de nombreuses techniques d'anesthésie dans la littérature pour l'IRMf du petit animal, ainsi que des études sur animaux conscients.

L'isoflurane/halothane léger (Kim et al. (2010)) et la kétamine (Shih et al. (2008)) ont été utilisés dans un certain nombre d'études, mais de façon plutôt anecdotique, et leur emploi est de moins en moins répandu. L' α -chloralose, quant à lui, est encore assez largement utilisé (Sanganahalli et al. (2008); Kida and Yamamoto (2008); Huttunen et al. (2008), ...). Il permet une bonne sédation tout en conservant des activations neuronales, mais produit aussi des activations non spécifiques (Austin et al. (2005)). De plus, la ventilation externe de l'animal est requise, ce qui complique considérablement la mise en place expérimentale et interdit un suivi longitudinal, même si la ventilation permet un contrôle rigoureux des paramètres physiologiques.

Ces dernières années ont vu l'avènement de l'anesthésie à la médétomidine, grâce à la mise en évidence par l'équipe de Mathias Hoehn de la faisabilité de l'IRMf du petit animal sous cette molécule (Adamczak et al. (2010); Spenger et al. (2000); Weber et al. (2006)). Ce mode de préparation animale est de plus en plus utilisé dans la littérature, car il présente peu d'inconvénients, et surtout permet un suivi longitudinal des animaux. (Pawela et al. (2009))

Ceci étant, les études en IRMf mesurant les variations de signal BOLD ne permettent pas d'effectuer des expériences sur le mouvement, les comportements sociaux ou des tâches cognitives conscientes (der Linden et al. (2007)), *a fortiori* sur animal anesthésié. Pour ces études fonctionnelles, il peut être intéressant d'utiliser des injections de manganèse pendant ces tâches, pour ensuite effectuer l'imagerie des réseaux activés, où le manganèse s'est logé¹. (Lin and Koretsky (1997); Aoki et al. (2004, 2002))

1. Le manganèse étant un analogue du calcium, il suit les chemins calciques. De plus, étant paramagnétique, il occasionne une forte diminution du T_1 et apparaît donc clairement sur des images anatomiques haute résolution en contraste T_1 .

J'ai moi-même mené plusieurs expérimentations utilisant le manganèse durant ma thèse. Une fois réglées les difficultés expérimentales, notamment dues à la toxicité du manganèse, ce dernier permet d'obtenir de belles images anatomiques. Toutefois, il est compliqué de mettre en place un protocole d'imagerie fonctionnelle. Nous avons notamment cherché à injecter du manganèse de manière systémique aux rats GAERS et à leurs contrôles non-épileptiques, afin d'obtenir une carte haute-résolution des zones déchargeant particulièrement lors des crises épileptiques, mais les résultats obtenus n'ont pas été suffisamment significatifs.

Traitement des données

À ma connaissance, très peu d'articles font mention de l'utilisation du logiciel SPM pour le traitement des données IRMf chez le rat (Schweinhart et al. (2003); Valdés-Hernández et al. (2011); Nie et al. (2012)), alors que ce logiciel est très largement utilisé chez l'homme. En effet, il permet un traitement automatisé et robuste des données IRMf (alignement, normalisation, lissage spatial, obtention de cartes statistiques), ainsi que des études multi-sujets ou encore des conceptions d'expériences aux paradigmes complexes. C'est pourquoi c'est ce logiciel que j'ai utilisé pour mes expériences.

On trouve dans la littérature soit des logiciels généraux de traitements statistiques (SYSTAT, SPSS), soit des logiciels spécialisés dans l'analyse des images fonctionnelles (STIMULATE (Spenger et al. (2000); Adamczak et al. (2010)), AFNI (Ferris et al. (2006)), FEAT (Huttunen et al. (2008))).

Stimulation

Paramètres de stimulation

Quelques études ont été menées sur l'optimisation des paramètres de stimulation, notamment en stimulation périphérique (Sanganahalli et al. (2008); Kida and Yamamoto (2008); Huttunen et al. (2008)). Les paramètres optimaux décrits dans la littérature dépendent de l'anesthésie utilisée (Kim et al. (2010)), et l'implantation exacte des électrodes dans la patte ou la queue joue certainement un rôle sur l'effet de cette stimulation.

Quant à la stimulation intracérébrale, très peu d'études ont été menées en IRMf chez le rat (Austin et al. (2003); Shyu et al. (2004a,b); Krautwald and Angenstein (2012)), et un seul de ces articles fait état d'une variation des paramètres de stimulation (Krautwald and Angenstein (2012)), là aussi dépendant de l'anesthésie. Il serait en effet particulièrement intéressant de s'attacher à observer les effets des différents paramètres (haute et basse fréquence, intensité, largeur d'impulsion) sur les activations, car il y a de fortes chances que les fibres recrutées par la stimulation dépendent de ces paramètres (Chaturvedi et al. (2006); McIntyre et al. (2006); Butson and McIntyre (2007)), et qu'on obtienne alors des résultats tout à fait différents selon les paramètres utilisés.

Électrodes

Les électrodes en carbone utilisées lors des expériences présentées au chapitre 10 ont donné de bons résultats, mais il est crucial d'apporter le plus grand soin à leur confection, dans une optique de reproductibilité des implantations. En effet, de faibles différences de diamètre ou de dénudage peuvent entraîner des variations importantes de stimulation (Butson and McIntyre (2006, 2005)).

Implantation

La chirurgie est un atout majeur pour la réussite des expériences en stimulation intracérébrale. On prendra grand soin à effectuer la chirurgie d'implantation de manière reproductible et la moins invasive possible, afin de limiter au maximum les artefacts importants occasionnés par cette chirurgie. De plus, il serait intéressant d'effectuer la chirurgie une semaine avant l'imagerie, afin d'éviter les zones sombres autour des électrodes dues aux traumatismes post-opératoires.

L'obtention d'images anatomiques haute définition, de toute manière nécessaire à la procédure de recalage sur l'atlas de Paxinos, permet de vérifier le lieu d'implantation des électrodes de manière satisfaisante, mais là aussi une vérification histologique serait souhaitable pour plus de rigueur.

En conclusion, si l'IRMF de la stimulation électrique intracérébrale chez le rat est certainement réalisable, il reste encore des validations expérimentales et des optimisations à effectuer avant des études exploratoires de routine.

De plus, les difficultés rencontrées pour obtenir des images autour des électrodes et dans certaines zones du cerveau impliquent qu'il serait intéressant de faire ces mêmes manipulations sur le primate non humain, ce qui permettrait de meilleures implantations, une meilleure imagerie, et surtout une meilleure transposition des résultats à l'homme.

En effet, il ne fait aucun doute que la stimulation électrique intracérébrale a encore de beaux jours devant elle, et le nombre de pathologies pour lesquelles on entrevoit son utilisation ne cesse de croître. Pourtant, il reste du chemin à parcourir pour comprendre les mécanismes de la stimulation, et les études en IRMF permettraient d'appréhender les effets de la stimulation sur le cerveau entier, et sont donc cruciales pour la compréhension de ses mécanismes.

Table des figures

1.1	Noyau précessant dans un champ magnétique statique	7
1.2	Repère tournant en RMN et impulsion radiofréquence	8
1.3	Ordres de grandeur de quelques temps de relaxation caractéristiques	9
1.4	Différents contrastes IRM	9
1.5	Sélection de tranche	10
1.6	Espace-k	11
1.7	Remplissage de l'espace-k lors d'une séquence d'imagerie traditionnelle	14
1.8	Remplissage de l'espace-k en Echo Planar Imaging	14
1.9	Principe de l'effet BOLD	15
1.10	Exemple d'image obtenue en IRM fonctionnelle	16
1.11	Effet de l'oxygène sur les images IRM	18
2.1	Exemple de pointes-ondes	21
2.2	Principe de la cartographie des réseaux épileptiques par IRMf/EEG	25
3.1	Schéma d'une implantation d'électrode de stimulation du nerf vague	28
3.2	Schéma de principe de la stimulation cérébrale profonde	31
4.1	Echantillonnage de l'espace-k lors d'une séquence EPI	41
4.2	Zone de couverture des séquences EPI	43
4.3	Scan de référence non corrigé	44
4.4	Repérage de l'écho sur une ligne du scan de référence	45
4.5	Scan de référence après correction	46
4.6	Influence de la correction par scan de référence sur une image IRM	46
4.7	Comparaison EPI single-shot / multi-shot	47
4.8	Trajectoire dans l'espace-k lors d'une acquisition EPI multishot	47
4.9	Obtention du régresseur IRMf à partir de la fonction stimulus	48
4.10	Traitements effectués sous SPM	49
4.11	Principe de la modélisation causale dynamique	51
4.12	Paramètres et équations du « balloon model » modélisant les variations BOLD	52
5.1	Molécule d'isoflurane	54
5.2	Enregistrements EEG sous différentes concentrations d'isoflurane	55

5.3	Molécule de kétamine	56
5.4	Enregistrements EEG et diagrammes temps fréquence sous kétamine	57
5.5	Molécule de dexmédétomidine.	58
5.6	Enregistrement EEG et diagramme temps fréquence sous médétomidine . . .	59
6.1	Images d'un cerveau de rat implanté par une électrode d'or	64
6.2	Image d'un cerveau de rat implanté par une électrode de carbone	65
6.3	Electrode en carbone destinée à une implantation intracérébrale chez le rat .	66
7.1	Variations de signal BOLD suite à un challenge gazeux	70
7.2	Stimulateur utilisé	72
7.3	IRMf de la stimulation de la patte	74
9.1	Variations de la fréquence cardiaque pendant la SNV	96
10.1	Protocole d'implantation d'électrodes intra-cérébrales	119
10.2	Artefacts provoqués par la présence des électrodes et de sang	120
10.3	Coordonnées d'implantation dans le noyau géniculé dorso-latéral	121
10.4	Stimulation du noyau géniculé dorso-latéral	122
10.5	Anatomie de l'hippocampe et connexions	122
10.6	Coordonnées d'implantation dans le gyrus dentelé	123
10.7	Stimulation du gyrus dentelé : activations	124
10.8	Stimulation du gyrus dentelé : décours temporel	124
10.9	Connectivités des ganglions de la base	125
10.10	Coordonnées d'implantation dans le striatum	126
10.11	Stimulation du striatum : activations	127
10.12	Stimulation du striatum : décours temporel	127
10.13	Coordonnées d'implantation dans le thalamus	128
10.14	Stimulation du thalamus : activations	129
10.15	Stimulation du thalamus : décours temporel	129

Table des abréviations

BOLD	Blood Oxygen Level Dependant
BW	<i>Bandwidth</i> : bande passante
DCM	<i>Dynamic Causal Modeling</i> : modélisation causale dynamique
DG	Gyrus dentelé
dHb	Désoxyhémoglobine
DLG	Noyau géniculé dorso-latéral
DPO	Décharge pointe-onde
EEG	Électroencéphalographie
EP	Noyau entopédonculaire
EPI	Echo-Planar Imaging
FOV	<i>Field of View</i> : champ de vue
FRH	Fonction de réponse hémodynamique
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GAERS	Genetic Absence Epilepsy Rat of Strasbourg
GE-EPI	Séquence EPI en écho de gradient
GIN	Grenoble institut des neurosciences
Glu	Glutamate
GPe	Globus pallidus externe
GPi	Globus pallidus interne
HbO₂	Oxyhémoglobine
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
IRMf/EEG	Imagerie par résonance magnétique couplée à l'électroencéphalographie
MDEFT	Modified driven equilibrium Fourier transform
MICI	Maladies chroniques de l'intestin
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique

NST	Noyau subthalamique
NTS	Noyau du tractus solitaire
RARE	Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement
RF	Radio-fréquence
SCP	Stimulation cérébrale profonde
SE-EPI	Séquence EPI en écho de spin
SEEG	Stéréo-électroencéphalographie
SEI	Stimulation électrique intracérébrale
SHF	Stimulation haute fréquence
SNr	Substance noire réticulée
SNV	Stimulation du nerf vague
SPM	Statistical Parametric Mapping
TEP	Tomographie par émission de positrons
VPL	Noyau ventro-postéro-latéral du thalamus
VPM	Noyau ventro-postéro-médian du thalamus

Bibliographie

- Adamczak, J. M., Farr, T. D., Seehafer, J. U., Kalthoff, D., and Hoehn, M. (2010). High field bold response to forepaw stimulation in the mouse. *Neuroimage*, 51(2) :704–712.
3 citations pages 131, 132, et 133
- Airaksinen, A. M., Niskanen, J.-P., Chamberlain, R., Huttunen, J. K., Nissinen, J., Garwood, M., Pitkänen, A., and Gröhn, O. (2010). Simultaneous fmri and local field potential measurements during epileptic seizures in medetomidine-sedated rats using raser pulse sequence. *Magn Reson Med*, 64(4) :1191–1199.
Cité page 58
- Albin, R. L., Young, A. B., and Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 12(10) :366–375.
Cité page 125
- Aoki, I., Naruse, S., and Tanaka, C. (2004). Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (memri) of brain activity and applications to early detection of brain ischemia. *NMR Biomed*, 17(8) :569–80.
Cité page 132
- Aoki, I., Tanaka, C., Takegami, T., Ebisu, T., Umeda, M., Fukunaga, M., Fukuda, K., Silva, A. C., Koretsky, A. P., and Naruse, S. (2002). Dynamic activity-induced manganese-dependent contrast magnetic resonance imaging (daim mri). *Magn Reson Med*, 48(6) :927–33.
Cité page 132
- Arantes, P. R., Cardoso, E. F., Barreiros, M. A., Teixeira, M. J., Gonçalves, M. R., Barbosa, E. R., Sukwinder, S. S., Leite, C. C., and Amaro, Jr, E. (2006). Performing functional magnetic resonance imaging in patients with parkinson's disease treated with deep brain stimulation. *Mov Disord*, 21(8) :1154–1162.
Cité page 33
- Austin, V. C., Blamire, A. M., Allers, K. A., Sharp, T., Styles, P., Matthews, P. M., and Sibson, N. R. (2005). Confounding effects of anesthesia on functional activation in rodent brain : a study of halothane and alpha-chloralose anesthesia. *Neuroimage*, 24(1) :92–100.
2 citations pages 53 et 132
- Austin, V. C., Blamire, A. M., Grieve, S. M., O'Neill, M. J., Styles, P., Matthews, P. M., and Sibson, N. R. (2003). Differences in the bold fmri response to direct and indirect cortical stimulation in the rat. *Magn Reson Med*, 49(5) :838–47.
4 citations pages 71, 117, 131, et 133
- Baker, K. B., Tkach, J., Hall, J. D., Nyenhuis, J. A., Shellock, F. G., and Rezai, A. R. (2005). Reduction of magnetic resonance imaging-related heating in deep brain stimulation leads using a lead management device. *Neurosurgery*, 57(4 Suppl) :392–7 ; discussion 392–7. Cité page 62
- Bammer, R., Skare, S., Newbould, R., Liu, C., Thijs, V., Ropele, S., Clayton, D. B., Krueger, G., Moseley, M. E., and Glover, G. H. (2005). Foundations of advanced magnetic resonance imaging. *NeuroRx*, 2(2) :167–196.
Cité page 5

- Belliveau, J. W., Kennedy, D. N., McKinstry, R. C., Buchbinder, B. R., Weisskoff, R. M., Cohen, M. S., Vevea, J. M., Brady, T. J., and Rosen, B. R. (1991). Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging. *Science*, 254(5032) :716–719. *Cité page 16*
- Ben-Menachem, E. (2002). Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy. *Lancet Neurol*, 1(8) :477–482. *Cité page 27*
- Benabid, A. L. (2007). What the future holds for deep brain stimulation. *Expert Rev Med Devices*, 4(6) :895–903. *Cité page 33*
- Benabid, A. L., Benazzous, A., and Pollak, P. (2002). Mechanisms of deep brain stimulation. *Mov Disord*, 17 Suppl 3 :S73–S74. *2 citations pages 30 et 32*
- Benabid, A. L., Koudsie, A., Benazzouz, A., Piallat, B., Krack, P., Limousin-Dowsey, P., Lebas, J. F., and Pollak, P. (2001). Deep brain stimulation for parkinson's disease. *Adv Neurol*, 86 :405–412. *Cité page 30*
- Benabid, A. L., Pollak, P., Louveau, A., Henry, S., and de Rougemont, J. (1987). Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the vim thalamic nucleus for bilateral parkinson disease. *Appl Neurophysiol*, 50(1-6) :344–346. *Cité page 30*
- Benazzouz, A., Piallat, B., Pollak, P., and Benabid, A. L. (1995). Responses of substantia nigra pars reticulata and globus pallidus complex to high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats : electrophysiological data. *Neurosci Lett*, 189(2) :77–80. *Cité page 32*
- Beurrier, C., Bioulac, B., Audin, J., and Hammond, C. (2001). High-frequency stimulation produces a transient blockade of voltage-gated currents in subthalamic neurons. *J Neurophysiol*, 85(4) :1351–1356. *Cité page 32*
- Bevan, M. D. and Wilson, C. J. (1999). Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons. *J Neurosci*, 19(17) :7617–7628. *Cité page 32*
- Bohning, D. E., Lomarev, M. P., Denslow, S., Nahas, Z., Shastri, A., and George, M. S. (2001). Feasibility of vagus nerve stimulation-synchronized blood oxygenation level-dependent functional mri. *Invest Radiol*, 36(8) :470–479. *Cité page 30*
- Boon, P., Vonck, K., D'Have, M., O'Connor, S., Vandekerckhove, T., and Reuck, J. D. (1999). Cost-benefit of vagus nerve stimulation for refractory epilepsy. *Acta Neurol Belg*, 99(4) :275–280. *Cité page 28*
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W., and Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405(6785) :458–462. *Cité page 28*
- Bourne, S. K., Eckhardt, C. A., Sheth, S. A., and Eskandar, E. N. (2012). Mechanisms of deep brain stimulation for obsessive compulsive disorder : effects upon cells and circuits. *Front Integr Neurosci*, 6 :29. *Cité page 31*
- Bruder, H., Fischer, H., Reinfelder, H. E., and Schmitt, F. (1992). Image reconstruction for echo planar imaging with nonequidistant k-space sampling. *Magn Reson Med*, 23(2) :311–323. *Cité page 41*

- Buonocore, M. H. and Zhu, D. C. (2001). Image-based ghost correction for interleaved epi. *Magn Reson Med*, 45(1) :96–108. *Cité page 44*
- Butson, C. R. and McIntyre, C. C. (2005). Tissue and electrode capacitance reduce neural activation volumes during deep brain stimulation. *Clin Neurophysiol*, 116(10) :2490–2500. *Cité page 134*
- Butson, C. R. and McIntyre, C. C. (2006). Role of electrode design on the volume of tissue activated during deep brain stimulation. *J Neural Eng*, 3(1) :1–8. *Cité page 134*
- Butson, C. R. and McIntyre, C. C. (2007). Differences among implanted pulse generator waveforms cause variations in the neural response to deep brain stimulation. *Clin Neurophysiol*, 118(8) :1889–94. *Cité page 133*
- Buxton, R. B., Wong, E. C., and Frank, L. R. (1998). Dynamics of blood flow and oxygenation changes during brain activation : the balloon model. *Magn Reson Med*, 39(6) :855–864. *Cité page 16*
- Canals, S., Beyerlein, M., Murayama, Y., and Logothetis, N. K. (2008). Electric stimulation fmri of the perforant pathway to the rat hippocampus. *Magn Reson Imaging*, 26(7) :978–986. *3 citations pages 34, 53, et 117*
- Carmichael, D. W., Pinto, S., Limousin-Dowsey, P., Thobois, S., Allen, P. J., Lemieux, L., Yousry, T., and Thornton, J. S. (2007). Functional mri with active, fully implanted, deep brain stimulation systems : safety and experimental confounds. *Neuroimage*, 37(2) :508–517. *3 citations pages 17, 33, et 62*
- Carmichael, D. W., Thornton, J. S., Rodionov, R., Thornton, R., McEvoy, A. W., Ordidge, R. J., Allen, P. J., and Lemieux, L. (2010). Feasibility of simultaneous intracranial eeg-fmri in humans : a safety study. *Neuroimage*, 49(1) :379–390. *Cité page 62*
- Chae, J.-H., Nahas, Z., Lomarev, M., Denslow, S., Lorberbaum, J. P., Bohning, D. E., and George, M. S. (2003). A review of functional neuroimaging studies of vagus nerve stimulation (vns). *J Psychiatr Res*, 37(6) :443–455. *Cité page 30*
- Chang, J.-Y. (2004). Brain stimulation for neurological and psychiatric disorders, current status and future direction. *J Pharmacol Exp Ther*, 309(1) :1–7. *Cité page 31*
- Chaturvedi, A., Butson, C. R., Cooper, S. E., and McIntyre, C. C. (2006). Subthalamic nucleus deep brain stimulation : accurate axonal threshold prediction with diffusion tensor based electric field models. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 1 :1240–1243. *Cité page 133*
- Chhabra, V., Sung, E., Mewes, K., Bakay, R. A. E., Abosch, A., and Gross, R. E. (2010). Safety of magnetic resonance imaging of deep brain stimulator systems : a serial imaging and clinical retrospective study. *J Neurosurg*, 112(3) :497–502. *Cité page 62*
- Clark, K. B., Naritoku, D. K., Smith, D. C., Browning, R. A., and Jensen, R. A. (1999). Enhanced recognition memory following vagus nerve stimulation in human subjects. *Nat Neurosci*, 2(1) :94–98. *Cité page 28*
- Dale, B., Wendt, M., and Duerk, J. L. (2001). A rapid look-up table method for reconstructing mr images from arbitrary k-space trajectories. *IEEE Trans Med Imaging*, 20(3) :207–217. *Cité page 41*

- Danober, L., Deransart, C., Depaulis, A., Vergnes, M., and Marescaux, C. (1998). Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol*, 55(1) :27–57. *Cité page 78*
- David, O., Guillemain, I., SAILLET, S., Reyt, S., Deransart, C., Segebarth, C., and Depaulis, A. (2008). Identifying neural drivers with functional mri : an electrophysiological validation. *PLoS Biol*, 6(12) :2683–2697. *4 citations pages 35, 53, 59, et 116*
- de Celis Alonso, B., Sergeyeve, M., Brune, K., and Hess, A. (2012). Lateralization of responses to vibrissal stimulation : Connectivity and information integration in the rat sensory-motor cortex assessed with fmri. *Neuroimage*. *Cité page 56*
- der Linden, A. V., Camp, N. V., Ramos-Cabrera, P., and Hoehn, M. (2007). Current status of functional mri on small animals : application to physiology, pathophysiology, and cognition. *NMR Biomed*, 20(5) :522–545. *Cité page 132*
- Desai, M., Kahn, I., Knoblich, U., Bernstein, J., Atallah, H., Yang, A., Kopell, N., Buckner, R. L., Graybiel, A. M., Moore, C. I., and Boyden, E. S. (2011). Mapping brain networks in awake mice using combined optical neural control and fmri. *J Neurophysiol*, 105(3) :1393–1405. *Cité page 17*
- Destexhe, A. (1992). *Aspects Non Lineaires de l'Activité Rythmique du Cerveau*. PhD thesis, Université libre de Bruxelles. *Cité page 21*
- Dodrill, C. B. and Morris, G. L. (2001). Reply. *Epilepsy Behav*, 2(2) :162. *Cité page 28*
- Dostrovsky, J. O. and Lozano, A. M. (2002). Mechanisms of deep brain stimulation. *Mov Disord*, 17 Suppl 3 :S63–S68. *Cité page 32*
- Dunn, J. F., Tuor, U. I., Kmech, J., Young, N. A., Henderson, A. K., Jackson, J. C., Valentine, P. A., and Teskey, G. C. (2009). Functional brain mapping at 9.4t using a new mri-compatible electrode chronically implanted in rats. *Magn Reson Med*, 61(1) :222–228. *Cité page 65*
- Duyn, J. H., Yang, Y., Frank, J. A., and van der Veen, J. W. (1998). Simple correction method for k-space trajectory deviations in mri. *J Magn Reson*, 132(1) :150–153. *Cité page 43*
- Feddersen, B., Vercueil, L., Noachtar, S., David, O., Depaulis, A., and Deransart, C. (2007). Controlling seizures is not controlling epilepsy : a parametric study of deep brain stimulation for epilepsy. *Neurobiol Dis*, 27(3) :292–300. *Cité page 78*
- Feinberg, D. A. and Oshio, K. (1994). Phase errors in multi-shot echo planar imaging. *Magn Reson Med*, 32(4) :535–539. *Cité page 44*
- Ferris, C. F., Febo, M., Luo, F., Schmidt, K., Brevard, M., Harder, J. A., Kulkarni, P., Messenger, T., and King, J. A. (2006). Functional magnetic resonance imaging in conscious animals : a new tool in behavioural neuroscience research. *J Neuroendocrinol*, 18(5) :307–318. *2 citations pages 17 et 133*
- Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., and Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy : definitions proposed by the international league against epilepsy (ilae) and the international bureau for epilepsy (ibe). *Epilepsia*, 46(4) :470–472. *Cité page 20*

- Fraix, V., Chabardes, S., Krainik, A., Seigneuret, E., Grand, S., cois Le Bas, J.-F., Krack, P., Benabid, A.-L., and Pollak, P. (2010). Effects of magnetic resonance imaging in patients with implanted deep brain stimulation systems. *J Neurosurg*. Cité page 62
- Friston, K. J., Harrison, L., and Penny, W. (2003). Dynamic causal modelling. *Neuroimage*, 19(4) :1273–1302. Cité page 50
- Friston, K. J., Mechelli, A., Turner, R., and Price, C. J. (2000). Nonlinear responses in fmri : the balloon model, volterra kernels, and other hemodynamics. *Neuroimage*, 12(4) :466–477. Cité page 50
- Garcia, L., Audin, J., D'Alessandro, G., Bioulac, B., and Hammond, C. (2003). Dual effect of high-frequency stimulation on subthalamic neuron activity. *J Neurosci*, 23(25) :8743–8751. Cité page 32
- Garcia, L., D'Alessandro, G., Fernagut, P.-O., Bioulac, B., and Hammond, C. (2005). Impact of high-frequency stimulation parameters on the pattern of discharge of subthalamic neurons. *J Neurophysiol*, 94(6) :3662–3669. 2 citations pages 32 et 33
- Grouiller, F. (2008). *Cartographie fonctionnelle du cerveau epileptique lors des evaluations pre-chirurgicales*. PhD thesis, Universite Joseph Fourier. 3 citations pages 15, 23, et 25
- Groves, D. A. and Brown, V. J. (2005). Vagal nerve stimulation : a review of its applications and potential mechanisms that mediate its clinical effects. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(3) :493–500. 2 citations pages 27 et 29
- Gupte, A. A., Shrivastava, D., Spaniol, M. A., and Abosch, A. (2011). Mri-related heating near deep brain stimulation electrodes : more data are needed. *Stereotact Funct Neurosurg*, 89(3) :131–140. Cité page 34
- Halpern, C. H., Wolf, J. A., Bale, T. L., Stunkard, A. J., Danish, S. F., Grossman, M., Jaggi, J. L., Grady, M. S., and Baltuch, G. H. (2008). Deep brain stimulation in the treatment of obesity. *J Neurosurg*, 109(4) :625–634. Cité page 31
- Harden, C. L., Pulver, M. C., Ravdin, L. D., Nikolov, B., Halper, J. P., and Labar, D. R. (2000). A pilot study of mood in epilepsy patients treated with vagus nerve stimulation. *Epilepsy Behav*, 1(2) :93–99. Cité page 28
- Hashimoto, T., Elder, C. M., Okun, M. S., Patrick, S. K., and Vitek, J. L. (2003). Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons. *J Neurosci*, 23(5) :1916–1923. Cité page 32
- Henderson, J. M., Tkach, J., Phillips, M., Baker, K., Shellock, F. G., and Rezai, A. R. (2005). Permanent neurological deficit related to magnetic resonance imaging in a patient with implanted deep brain stimulation electrodes for parkinson's disease : case report. *Neurosurgery*, 57(5) :E1063 ; discussion E1063. Cité page 62
- Hennel, F. (1998). Image-based reduction of artifacts in multishot echo-planar imaging. *J Magn Reson*, 134(2) :206–213. Cité page 44

- Hesselmann, V., Sorger, B., Girnus, R., Lasek, K., Maarouf, M., Wedekind, C., Bunke, J., Schulte, O., Krug, B., Lackner, K., and Sturm, V. (2004). Intraoperative functional mri as a new approach to monitor deep brain stimulation in parkinson's disease. *Eur Radiol*, 14(4) :686–690.
Cité page 33
- Huttunen, J. K., Gröhn, O., and Penttonen, M. (2008). Coupling between simultaneously recorded bold response and neuronal activity in the rat somatosensory cortex. *Neuroimage*, 39(2) :775–785.
2 citations pages 132 et 133
- Jech, R., Urgosík, D., Tintera, J., Nebuzelský, A., Krásenský, J., Liscák, R., Roth, J., and Rezicka, E. (2001). Functional magnetic resonance imaging during deep brain stimulation : a pilot study in four patients with parkinson's disease. *Mov Disord*, 16(6) :1126–1132. Cité page 34
- Journée, H. L. (2003). Comment on jech et al, fmri imaging during deep brain stimulation. *Mov Disord*, 18(4) :460–1 ; author reply 461–2. Cité page 34
- Jupp, B., Williams, J. P., Tesiram, Y. A., Vosmansky, M., and O'Brien, T. J. (2006). Mri compatible electrodes for the induction of amygdala kindling in rats. *J Neurosci Methods*, 155(1) :72–76.
2 citations pages 63 et 64
- Kahane, P. and Depaulis, A. (2010). Deep brain stimulation in epilepsy : what is next ? *Curr Opin Neurol*, 23(2) :177–182. Cité page 31
- Kannurpatti, S. S., Biswal, B. B., and Hudetz, A. G. (2003). Baseline physiological state and the fmri-bold signal response to apnea in anesthetized rats. *NMR Biomed*, 16(5) :261–268.
Cité page 69
- Khubchandani, M. and Jagannathan, N. R. (2004). Simultaneous electrophysiology and functional magnetic resonance imaging studies in conscious rats. *Methods Enzymol*, 385 :63–84.
Cité page 17
- Khubchandani, M., Mallick, H. N., Jagannathan, N. R., and Kumar, V. M. (2003). Stereotaxic assembly and procedures for simultaneous electrophysiological and mri study of conscious rat. *Magn Reson Med*, 49(5) :962–967. Cité page 17
- Kida, I. and Yamamoto, T. (2008). Stimulus frequency dependence of blood oxygenation level-dependent functional magnetic resonance imaging signals in the somatosensory cortex of rats. *Neurosci Res*, 62(1) :25–31.
2 citations pages 132 et 133
- Kim, T., Masamoto, K., Fukuda, M., Vazquez, A., and Kim, S.-G. (2010). Frequency-dependent neural activity, cbf, and bold fmri to somatosensory stimuli in isoflurane-anesthetized rats. *Neuroimage*, 52(1) :224–233.
4 citations pages 55, 56, 132, et 133
- King, J. A., Garelick, T. S., Brevard, M. E., Chen, W., Messenger, T. L., Duong, T. Q., and Ferris, C. F. (2005). Procedure for minimizing stress for fmri studies in conscious rats. *J Neurosci Methods*, 148(2) :154–160. Cité page 17
- Krautwald, K. and Angenstein, F. (2012). Low frequency stimulation of the perforant pathway generates anesthesia-specific variations in neural activity and bold responses in the rat dentate gyrus. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(2) :291–305.
2 citations pages 58 et 133

- Kwan, P. and Brodie, M. J. (2000). Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med*, 342(5) :314–319. *Cité page 32*
- Lado, F. A. (2006). Chronic bilateral stimulation of the anterior thalamus of kainate-treated rats increases seizure frequency. *Epilepsia*, 47(1) :27–32. *Cité page 32*
- Lahti, K. M., Ferris, C. F., Li, F., Sotak, C. H., and King, J. A. (1998). Imaging brain activity in conscious animals using functional mri. *J Neurosci Methods*, 82(1) :75–83. *Cité page 17*
- Lahti, K. M., Ferris, C. F., Li, F., Sotak, C. H., and King, J. A. (1999). Comparison of evoked cortical activity in conscious and propofol-anesthetized rats using functional mri. *Magn Reson Med*, 41(2) :412–416. *2 citations pages 17 et 71*
- Larson, P. S., Richardson, R. M., Starr, P. A., and Martin, A. J. (2008). Magnetic resonance imaging of implanted deep brain stimulators : experience in a large series. *Stereotact Funct Neurosurg*, 86(2) :92–100. *Cité page 62*
- Lau, C., Zhang, J. W., Xing, K. K., Zhou, I. Y., Cheung, M. M., Chan, K. C., and Wu, E. X. (2011a). Bold responses in the superior colliculus and lateral geniculate nucleus of the rat viewing an apparent motion stimulus. *Neuroimage*, 58(3) :878–884. *Cité page 121*
- Lau, C., Zhou, I. Y., Cheung, M. M., Chan, K. C., and Wu, E. X. (2011b). Bold temporal dynamics of rat superior colliculus and lateral geniculate nucleus following short duration visual stimulation. *PLoS One*, 6(4) :e18914. *Cité page 121*
- Lee, K. H., Roberts, D. W., and Kim, U. (2003). Effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on subthalamic neurons : an intracellular study. *Stereotact Funct Neurosurg*, 80(1-4) :32–36. *Cité page 32*
- Lee, K. J., Barber, D. C., Paley, M. N., Wilkinson, I. D., Papadakis, N. G., and Griffiths, P. D. (2002). Image-based epi ghost correction using an algorithm based on projection onto convex sets (pocs). *Magn Reson Med*, 47(4) :812–817. *Cité page 44*
- Lee, K. J., Papadakis, N. G., Barber, D. C., Wilkinson, I. D., Griffiths, P. D., and Paley, M. N. J. (2004). A method of generalized projections (mgp) ghost correction algorithm for interleaved epi. *IEEE Trans Med Imaging*, 23(7) :839–848. *Cité page 44*
- Lin, Y. J. and Koretsky, A. P. (1997). Manganese ion enhances t1-weighted mri during brain activation : an approach to direct imaging of brain function. *Magn Reson Med*, 38(3) :378–388. *Cité page 132*
- Liu, Z. M., Schmidt, K. F., Sicard, K. M., and Duong, T. Q. (2004). Imaging oxygen consumption in forepaw somatosensory stimulation in rats under isoflurane anesthesia. *Magn Reson Med*, 52(2) :277–285. *Cité page 56*
- Lockman, J. and Fisher, R. S. (2009). Therapeutic brain stimulation for epilepsy. *Neurol Clin*, 27(4) :1031–1040. *Cité page 31*
- Logothetis, N. K. (2002). The neural basis of the blood-oxygen-level-dependent functional magnetic resonance imaging signal. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357(1424) :1003–1037. *Cité page 16*

- Logothetis, N. K., Augath, M., Murayama, Y., Rauch, A., Sultan, F., Goense, J., Oeltermann, A., and Merkle, H. (2010). The effects of electrical microstimulation on cortical signal propagation. *Nat Neurosci*, 13(10) :1283–1291. *2 citations pages 34 et 117*
- Lozano, A. M., Giacobbe, P., Hamani, C., Rizvi, S. J., Kennedy, S. H., Kolivakis, T. T., Debonnel, G., Sadikot, A. F., Lam, R. W., Howard, A. K., Ilcewicz-Klimek, M., Honey, C. R., and Mayberg, H. S. (2012). A multicenter pilot study of subcallosal cingulate area deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *J Neurosurg*, 116(2) :315–322. *Cité page 31*
- Lozano, A. M., Mayberg, H. S., Giacobbe, P., Hamani, C., Craddock, R. C., and Kennedy, S. H. (2008). Subcallosal cingulate gyrus deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry*, 64(6) :461–467. *Cité page 31*
- Magarnos-Ascone, C., Pazo, J. H., Macadar, O., and Buno, W. (2002). High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus silences subthalamic neurons : a possible cellular mechanism in parkinson's disease. *Neuroscience*, 115(4) :1109–1117. *Cité page 32*
- Mallet, L., Polosan, M., Jaafari, N., Baup, N., Welter, M.-L., Fontaine, D., du Montcel, S. T., Yelnik, J., Chéreau, I., Arbus, C., Raoul, S., Aouizerate, B., Damier, P., Chabardès, S., Czernecki, V., Ardouin, C., Krebs, M.-O., Bardinnet, E., Chaynes, P., Burbaud, P., Cornu, P., Derost, P., Bougerol, T., Bataille, B., Mattei, V., Dormont, D., Devaux, B., Vérin, M., Houeto, J.-L., Pollak, P., Benabid, A.-L., Agid, Y., Krack, P., Millet, B., Pelissolo, A., and , S. T. O. C. S. G. (2008). Subthalamic nucleus stimulation in severe obsessive-compulsive disorder. *N Engl J Med*, 359(20) :2121–2134. *Cité page 31*
- Malow, B. A., Edwards, J., Marzec, M., Sagher, O., Ross, D., and Fromes, G. (2001). Vagus nerve stimulation reduces daytime sleepiness in epilepsy patients. *Neurology*, 57(5) :879–884. *Cité page 28*
- Marescaux, C., Vergnes, M., and Depaulis, A. (1992a). Genetic absence epilepsy in rats from strasbourg—a review. *J Neural Transm Suppl*, 35 :37–69. *Cité page 78*
- Marescaux, C., Vergnes, M., and Depaulis, A. (1992b). Neurotransmission in rats' spontaneous generalized nonconvulsive epilepsy. *Epilepsy Res Suppl*, 8 :335–43. *Cité page 78*
- Martin, P. R. (1986). The projection of different retinal ganglion cell classes to the dorsal lateral geniculate nucleus in the hooded rat. *Exp Brain Res*, 62(1) :77–88. *Cité page 121*
- Martindale, J., Mayhew, J., Berwick, J., Jones, M., Martin, C., Johnston, D., Redgrave, P., and Zheng, Y. (2003). The hemodynamic impulse response to a single neural event. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(5) :546–555. *Cité page 16*
- Masamoto, K., Fukuda, M., Vazquez, A., and Kim, S.-G. (2009). Dose-dependent effect of isoflurane on neurovascular coupling in rat cerebral cortex. *Eur J Neurosci*, 30(2) :242–250. *2 citations pages 55 et 69*
- Mason, G. F., Harshbarger, T., Hetherington, H. P., Zhang, Y., Pohost, G. M., and Twieg, D. B. (1997). A method to measure arbitrary k-space trajectories for rapid mr imaging. *Magn Reson Med*, 38(3) :492–496. *Cité page 43*

- Maurice, N., Thierry, A.-M., Glowinski, J., and Deniau, J.-M. (2003). Spontaneous and evoked activity of substantia nigra pars reticulata neurons during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci*, 23(30) :9929–9936. *Cité page 33*
- McIntyre, C. C., Butson, C. R., Moks, C. B., and Noecker, A. M. (2006). Optimizing deep brain stimulation parameter selection with detailed models of the electrode-tissue interface. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 1 :893–895. *Cité page 133*
- McIntyre, C. C., Savasta, M., Goff, L. K.-L., and Vitek, J. L. (2004a). Uncovering the mechanism(s) of action of deep brain stimulation : activation, inhibition, or both. *Clin Neurophysiol*, 115(6) :1239–1248. *Cité page 32*
- McIntyre, C. C., Savasta, M., Walter, B. L., and Vitek, J. L. (2004b). How does deep brain stimulation work ? present understanding and future questions. *J Clin Neurophysiol*, 21(1) :40–50. *Cité page 32*
- Meregnani, J. (2009). *Effet anti-inflammatoire de l'électrostimulation vagale appliquée à un modèle de colite expérimentale*. PhD thesis, Université de Grenoble. *2 citations pages 28 et 29*
- Meregnani, J., Clarençon, D., Vivier, M., Peinnequin, A., Mouret, C., Sinniger, V., Picq, C., Job, A., Canini, F., Jacquier-Sarlin, M., and Bonaz, B. (2011). Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Auton Neurosci*, 160(1-2) :82–89. *Cité page 28*
- Moriguchi, H. and Duerk, J. L. (2004). Iterative next-neighbor regridding (innng) : improved reconstruction from nonuniformly sampled k-space data using rescaled matrices. *Magn Reson Med*, 51(2) :343–352. *Cité page 41*
- Moro, E., Esselink, R. J. A., Xie, J., Hommel, M., Benabid, A. L., and Pollak, P. (2002). The impact on parkinson's disease of electrical parameter settings in stn stimulation. *Neurology*, 59(5) :706–713. *Cité page 33*
- Nair, G. and Duong, T. Q. (2004). Echo-planar bold fmri of mice on a narrow-bore 9.4 t magnet. *Magn Reson Med*, 52(2) :430–434. *4 citations pages 55, 56, 71, et 132*
- Nelson, T. S., Suhr, C. L., Freestone, D. R., Lai, A., Halliday, A. J., McLean, K. J., Burkitt, A. N., and Cook, M. J. (2011). Closed-loop seizure control with very high frequency electrical stimulation at seizure onset in the gaers model of absence epilepsy. *Int J Neural Syst*, 21(2) :163–173. *Cité page 78*
- Nie, B., Chen, K., Zhao, S., Liu, J., Gu, X., Yao, Q., Hui, J., Zhang, Z., Teng, G., Zhao, C., and Shan, B. (2012). A rat brain mri template with digital stereotaxic atlas of fine anatomical delineations in paxinos space and its automated application in voxel-wise analysis. *Hum Brain Mapp*. *Cité page 133*
- Nitz, W. R. (2002). Fast and ultrafast non-echo-planar mr imaging techniques. *Eur Radiol*, 12(12) :2866–2882. *Cité page 13*
- Ogawa, S., Lee, T. M., Kay, A. R., and Tank, D. W. (1990a). Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(24) :9868–9872. *Cité page 15*

- Ogawa, S., Lee, T. M., Nayak, A. S., and Glynn, P. (1990b). Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magn Reson Med*, 14(1) :68–78. *Cité page 18*
- Ooi, Y. C., Styliaras, J. C., and Sharan, A. (2011). Thalamic stimulation for epilepsy. *Neurosurg Clin N Am*, 22(4) :457–64, v–vi. *Cité page 31*
- Pawela, C. P., Biswal, B. B., Cho, Y. R., Kao, D. S., Li, R., Jones, S. R., Schulte, M. L., Matloub, H. S., Hudetz, A. G., and Hyde, J. S. (2008). Resting-state functional connectivity of the rat brain. *Magn Reson Med*, 59(5) :1021–1029. *Cité page 58*
- Pawela, C. P., Biswal, B. B., Hudetz, A. G., Schulte, M. L., Li, R., Jones, S. R., Cho, Y. R., Matloub, H. S., and Hyde, J. S. (2009). A protocol for use of medetomidine anesthesia in rats for extended studies using task-induced bold contrast and resting-state functional connectivity. *Neuroimage*, 46(4) :1137–1147. *2 citations pages 58 et 132*
- Paxinos, G. and Waxton, C. (1997). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press. *Cité page 66*
- Peeters, R. R., Tindemans, I., Schutter, E. D., and der Linden, A. V. (2001). Comparing bold fmri signal changes in the awake and anesthetized rat during electrical forepaw stimulation. *Magn Reson Imaging*, 19(6) :821–826. *Cité page 53*
- Picq, C. (2012). *Relations neurodigestives et stimulation basse fréquence chez le rat anesthésié : implications du système nerveux central et du système immunitaire*. PhD thesis, Université de Grenoble - CRSSA. *2 citations pages 28 et 96*
- Porro, C. A., Cavazzuti, M., Giuliani, D., Vellani, V., Lui, F., and Baraldi, P. (2004). Effects of ketamine anesthesia on central nociceptive processing in the rat : a 2-deoxyglucose study. *Neuroscience*, 125(2) :485–494. *Cité page 56*
- Reyt, S., Picq, C., Sinniger, V., Clarençon, D., Bonaz, B., and David, O. (2010). Dynamic causal modelling and physiological confounds : a functional mri study of vagus nerve stimulation. *Neuroimage*, 52(4) :1456–1464. *2 citations pages 30 et 35*
- Rezai, A. R., Phillips, M., Baker, K. B., Sharan, A. D., Nyenhuis, J., Tkach, J., Henderson, J., and Shellock, F. G. (2004). Neurostimulation system used for deep brain stimulation (dbs) : Mr safety issues and implications of failing to follow safety recommendations. *Invest Radiol*, 39(5) :300–303. *Cité page 62*
- Rizzone, M., Lanotte, M., Bergamasco, B., Tavella, A., Torre, E., Faccani, G., Melcarne, A., and Lopiano, L. (2001). Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in parkinson's disease : effects of variation in stimulation parameters. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71(2) :215–219. *Cité page 33*
- Rolston, J. D., Desai, S. A., Laxpati, N. G., and Gross, R. E. (2011). Electrical stimulation for epilepsy : experimental approaches. *Neurosurg Clin N Am*, 22(4) :425–42, v. *Cité page 31*
- Saillet, S., Gharbi, S., Charvet, G., Deransart, C., Guillemaud, R., Depaulis, A., and David, O. (2012). Neural adaptation to responsive stimulation : A comparison of auditory and deep brain stimulation in a rat model of absence epilepsy. *Brain Stimul*. *Cité page 78*

- Saillet, S., Langlois, M., Feddersen, B., Minotti, L., Vercueil, L., Chabardès, S., David, O., Depaulis, A., Deransart, C., and Kahane, P. (2009). Manipulating the epileptic brain using stimulation : a review of experimental and clinical studies. *Epileptic Disord*, 11(2) :100–112.
2 citations pages 19 et 78
- Salin, P., Manrique, C., Forni, C., and Goff, L. K.-L. (2002). High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus selectively reverses dopamine denervation-induced cellular defects in the output structures of the basal ganglia in the rat. *J Neurosci*, 22(12) :5137–5148.
Cité page 32
- Sanganahalli, B. G., Herman, P., and Hyder, F. (2008). Frequency-dependent tactile responses in rat brain measured by functional mri. *NMR Biomed*, 21(4) :410–416.
2 citations pages 132 et 133
- Schmidt, F., Stehling, M., and Turner, R. (1998). *Echo-Planar Imaging; Theory, Techniques and Applications*. Springer.
Cité page 45
- Schweinhardt, P., Fransson, P., Olson, L., Spenger, C., and Andersson, J. L. R. (2003). A template for spatial normalisation of mr images of the rat brain. *J Neurosci Methods*, 129(2) :105–13.
2 citations pages 72 et 133
- Semah, F. (2002). Pet imaging in epilepsy : basal ganglia and thalamic involvement. *Epileptic Disord*, 4 Suppl 3 :S55–S60.
Cité page 31
- Sharan, A., Rezai, A. R., Nyenhuis, J. A., Hrdlicka, G., Tkach, J., Baker, K., Turbay, M., Rugieri, P., Phillips, M., and Shellock, F. G. (2003). Mr safety in patients with implanted deep brain stimulation systems (dbs). *Acta Neurochir Suppl*, 87 :141–145.
Cité page 62
- Shih, Y.-Y. I., Chang, C., Chen, J.-C., and Jaw, F.-S. (2008). Bold fmri mapping of brain responses to nociceptive stimuli in rats under ketamine anesthesia. *Med Eng Phys*.
3 citations pages 57, 131, et 132
- Shyu, B.-C., Lin, C.-Y., Sun, J.-J., Chen, S.-L., and Chang, C. (2004a). Bold response to direct thalamic stimulation reveals a functional connection between the medial thalamus and the anterior cingulate cortex in the rat. *Magn Reson Med*, 52(1) :47–55.
3 citations pages 117, 131, et 133
- Shyu, B.-C., Lin, C.-Y., Sun, J.-J., Sylantyev, S., and Chang, C. (2004b). A method for direct thalamic stimulation in fmri studies using a glass-coated carbon fiber electrode. *J Neurosci Methods*, 137(1) :123–31.
2 citations pages 117 et 133
- Sicard, K., Shen, Q., Brevard, M. E., Sullivan, R., Ferris, C. F., King, J. A., and Duong, T. Q. (2003). Regional cerebral blood flow and bold responses in conscious and anesthetized rats under basal and hypercapnic conditions : implications for functional mri studies. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(4) :472–481.
Cité page 69
- Spenger, C., Josephson, A., Klason, T., Hoehn, M., Schwindt, W., Ingvar, M., and Olson, L. (2000). Functional mri at 4.7 tesla of the rat brain during electric stimulation of forepaw, hindpaw, or tail in single- and multislice experiments. *Exp Neurol*, 166(2) :246–253.
5 citations pages 53, 71, 131, 132, et 133

- Stefani, A., Fedele, E., Pierantozzi, M., Galati, S., Marzetti, F., Peppe, A., Pastore, F. S., Bernardi, G., and Stanzione, P. (2011a). Reduced gaba content in the motor thalamus during effective deep brain stimulation of the subthalamic nucleus. *Front Syst Neurosci*, 5 :17. Cité page 33
- Stefani, A., Fedele, E., Vitek, J., Pierantozzi, M., Galati, S., Marzetti, F., Peppe, A., Bassi, M. S., Bernardi, G., and Stanzione, P. (2011b). The clinical efficacy of l-dopa and stn-dbs share a common marker : reduced gaba content in the motor thalamus. *Cell Death Dis*, 2 :e154. Cité page 33
- Stefurak, T., Mikulis, D., Mayberg, H., Lang, A. E., Hevenor, S., Pahapill, P., Saint-Cyr, J., and Lozano, A. (2003). Deep brain stimulation for parkinson's disease dissociates mood and motor circuits : a functional mri case study. *Mov Disord*, 18(12) :1508–1516. Cité page 34
- Stephan, K. E., Kasper, L., Harrison, L. M., Daunizeau, J., den Ouden, H. E. M., Breakspear, M., and Friston, K. J. (2008). Nonlinear dynamic causal models for fmri. *Neuroimage*, 42(2) :649–662. Cité page 51
- Stephan, K. E., Penny, W. D., Moran, R. J., den Ouden, H. E. M., Daunizeau, J., and Friston, K. J. (2010). Ten simple rules for dynamic causal modeling. *Neuroimage*, 49(4) :3099–3109. Cité page 50
- Stephan, K. E., Weiskopf, N., Drysdale, P. M., Robinson, P. A., and Friston, K. J. (2007). Comparing hemodynamic models with dcm. *Neuroimage*, 38(3) :387–401. Cité page 52
- Stroman, P. W., Krause, V., Frankenstein, U. N., Malisza, K. L., and Tomanek, B. (2001). Spin-echo versus gradient-echo fmri with short echo times. *Magn Reson Imaging*, 19(6) :827–831. 2 citations pages 62 et 132
- Stypulkowski, P. H., Giftakis, J. E., and Billstrom, T. M. (2011). Development of a large animal model for investigation of deep brain stimulation for epilepsy. *Stereotact Funct Neurosurg*, 89(2) :111–122. Cité page 32
- Tai, C.-H., Boraud, T., Bezard, E., Bioulac, B., Gross, C., and Benazzouz, A. (2003). Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridles neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *FASEB J*, 17(13) :1820–1830. Cité page 32
- Tenney, J. R., Duong, T. Q., King, J. A., and Ferris, C. F. (2004). Fmri of brain activation in a genetic rat model of absence seizures. *Epilepsia*, 45(6) :576–582. Cité page 17
- Tenney, J. R., Duong, T. Q., King, J. A., Ludwig, R., and Ferris, C. F. (2003). Corticothalamic modulation during absence seizures in rats : a functional mri assessment. *Epilepsia*, 44(9) :1133–1140. Cité page 17
- Tronnier, V. M., Staubert, A., Ahnel, S. H., and Sarem-Aslani, A. (1999). Magnetic resonance imaging with implanted neurostimulators : an in vitro and in vivo study. *Neurosurgery*, 44(1) :118–25 ; discussion 125–6. Cité page 62
- Uitti, R. J., Tsuboi, Y., Pooley, R. A., Putzke, J. D., Turk, M. F., Wszolek, Z. K., Witte, R. J., and Wharen, R. E. (2002). Magnetic resonance imaging and deep brain stimulation. *Neurosurgery*, 51(6) :1423–28 ; discussion 1428–31. Cité page 62

- Valdés-Hernández, P. A., Sumiyoshi, A., Nonaka, H., Haga, R., Aubert-Vásquez, E., Ogawa, T., Iturria-Medina, Y., Riera, J. J., and Kawashima, R. (2011). An in vivo mri template set for morphometry, tissue segmentation, and fmri localization in rats. *Front Neuroinform*, 5 :26. *Cité page 133*
- Vercueil, L. and Hirsch, E. (2002). Seizures and the basal ganglia : a review of the clinical data. *Epileptic Disord*, 4 Suppl 3 :S47–S54. *Cité page 31*
- Vergnes, M., Marescaux, C., Micheletti, G., Reis, J., Depaulis, A., Rumbach, L., and Warter, J. M. (1982). Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat : a model of generalized non-convulsive epilepsy. *Neurosci Lett*, 33(1) :97–101. *Cité page 78*
- Warnking, J. (2002). *Délinéation des aires visuelles rétinotopiques chez l'homme par IRM fonctionnelle*. PhD thesis, Université Joseph Fourier. *Cité page 9*
- Weber, R., Ramos-Cabrera, P., Wiedermann, D., van Camp, N., and Hoehn, M. (2006). A fully noninvasive and robust experimental protocol for longitudinal fmri studies in the rat. *Neuroimage*, 29(4) :1303–1310. *5 citations pages 54, 58, 73, 131, et 132*
- Wey, H.-Y., Wang, D. J., and Duong, T. Q. (2011). Baseline cbf, and bold, cbf, and cmro2 fmri of visual and vibrotactile stimulations in baboons. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(2) :715–724. *Cité page 57*
- Williams, K. A., Magnuson, M., Majeed, W., Laconte, S. M., Peltier, S. J., Hu, X., and Keilholz, S. D. (2010). Comparison of alpha-chloralose, medetomidine and isoflurane anesthesia for functional connectivity mapping in the rat. *Magn Reson Imaging*, 28(7) :995–1003. *2 citations pages 53 et 58*
- Windels, F., Bruet, N., Poupard, A., Feuerstein, C., Bertrand, A., and Savasta, M. (2003). Influence of the frequency parameter on extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid in substantia nigra and globus pallidus during electrical stimulation of subthalamic nucleus in rats. *J Neurosci Res*, 72(2) :259–267. *Cité page 33*
- Windels, F., Bruet, N., Poupard, A., Urbain, N., Chouvet, G., Feuerstein, C., and Savasta, M. (2000). Effects of high frequency stimulation of subthalamic nucleus on extracellular glutamate and gaba in substantia nigra and globus pallidus in the normal rat. *Eur J Neurosci*, 12(11) :4141–4146. *Cité page 32*
- Wyckhuys, T., De Smedt, T., Claeys, P., Raedt, R., Waterschoot, L., Vonck, K., Van den Broecke, C., Mabilde, C., Leybaert, L., Wadman, W., and Boon, P. (2007). High frequency deep brain stimulation in the hippocampus modifies seizure characteristics in kindled rats. *Epilepsia*, 48(8) :1543–1550. *Cité page 32*
- Wyckhuys, T., Geerts, P. J., Raedt, R., Vonck, K., Wadman, W., and Boon, P. (2009). Deep brain stimulation for epilepsy : knowledge gained from experimental animal models. *Acta Neurol Belg*, 109(2) :63–80. *Cité page 31*
- Zhao, F., Williams, M., Meng, X., Welsh, D. C., Coimbra, A., Crown, E. D., Cook, J. J., Urban, M. O., Hargreaves, R., and Williams, D. S. (2008a). Bold and blood volume-weighted fmri of rat lumbar spinal cord during non-noxious and noxious electrical hindpaw stimulation. *Neuroimage*, 40(1) :133–147. *Cité page 71*

- Zhao, F., Zhao, T., Zhou, L., Wu, Q., and Hu, X. (2008b). Bold study of stimulation-induced neural activity and resting-state connectivity in medetomidine-sedated rat. *Neuroimage*, 39(1) :248–260. *2 citations pages 58 et 131*
- Zhong, X.-L., Yu, J.-T., Zhang, Q., Wang, N.-D., and Tan, L. (2011). Deep brain stimulation for epilepsy in clinical practice and in animal models. *Brain Res Bull*, 85(3-4) :81–88. *Cité page 32*
- Zou, P., Hutchins, S. B., Dutkiewicz, R. M., Li, C.-S., and Ogg, R. J. (2005). Effects of epi readout bandwidth on measured activation map and bold response in fmri experiments. *Neuroimage*, 27(1) :15–25. *Cité page 42*
- Zrinzo, L., Yoshida, F., Hariz, M. I., Thornton, J., Foltynie, T., Yousry, T. A., and Limousin, P. (2011). Clinical safety of brain magnetic resonance imaging with implanted deep brain stimulation hardware : large case series and review of the literature. *World Neurosurg*, 76(1-2) :164–72 ; discussion 69–73. *Cité page 34*